

UNTERSUCHUNGEN VON METHYLTRANSFERASEN AUS *LINUM*-ARTEN

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jennifer Robinson

aus Augsburg

Marburg/Lahn 2018

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Erstgutachter: **Prof. Dr. Maike Petersen**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Andreas Heine**

Eingereicht am **08.05.2018**

Tag der mündlichen Prüfung am **25.06.2018**

Hochschulkennziffer: 1180

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Untersuchungen von Methyltransferasen aus *Linum*-Arten“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 08.05.2018

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung	1
1.1. <i>Linum</i> -Arten.....	1
1.2. Zellkulturen	3
1.3. Lignanbiosynthese	4
1.3.1. Frühe Schritte der Lignanbiosynthese	4
1.3.2. Späte Schritte der Lignanbiosynthese	6
1.3.3. Biosynthese zu Desmethylepipodophyllotoxin	10
1.3.4. Podophyllotoxin.....	11
1.4. Methyltransferasen.....	13
1.5. Ziel dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1. Geräte- und Reagenzienlisten	17
2.1.1. Geräte	17
2.1.2. Reagenzien	20
2.1.3. Molekularbiologische Reagenzien und Kits	24
2.2. Kulturmedien für Pflanzen	25
2.2.1. Stammlösungen	25
2.2.2. Medienzusammensetzung.....	27
2.3. Nährmedien für Bakterienkulturen	29
2.4. Arbeiten mit Zellkulturen.....	29
2.4.1. Kallus- und Suspensionskulturen	29
2.4.2. Anlegen neuer Kallus- und Suspensionskulturen von <i>Linum nodiflorum</i>	30
2.4.3. Lignanextraktion.....	30
2.4.4. Elicitierung	31
2.4.5. Kulturcharakterisierung	31
2.4.5.1. Mediumsparameter	32

2.4.5.2.	Enzymrohextrakt	32
2.4.5.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	32
2.4.5.4.	Aktivität der Phenylalanin Ammoniak-Lyase	32
2.4.5.5.	Untersuchung der Genexpression	33
2.4.6.	Mikrosomenpräparation.....	33
2.5.	Molekularbiologie	35
2.5.1.	Isolierung von genomischer DNA	35
2.5.2.	Isolierung von RNA	36
2.5.3.	cDNA-Synthese.....	37
2.5.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.5.4.1.	Standard-PCR.....	37
2.5.4.2.	Degenerierte Primer für Standard-PCR.....	38
2.5.4.3.	3' RACE PCR.....	39
2.5.4.4.	5' RACE PCR.....	42
2.5.4.5.	PCR mit Phusion-Polymerase	44
2.5.5.	Gelelektrophorese	45
2.5.6.	Gelextraktion	45
2.5.7.	Ligation	46
2.5.7.1.	Ligation in einen Klonierungsvektor.....	46
2.5.7.2.	Ligation in Expressionsvektoren.....	46
2.5.8.	Herstellung kompetenter Zellen.....	47
2.5.9.	Transformation	47
2.5.10.	Übernachtskulturen	48
2.5.11.	Plasmidpräparation	48
2.5.12.	Restriktionsverdau	49
2.5.12.1.	pDrive	49
2.5.12.2.	pET15b	49
2.5.12.3.	pRSET C.....	50
2.5.13.	SMARTer® RACE 5'/3' Kit	50

2.5.13.1.	cDNA-Synthese.....	50
2.5.13.2.	PCR	51
2.5.13.3.	Primer	53
2.5.13.4.	In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech).....	53
2.5.13.5.	Restriktionsverdau	53
2.5.14.	Quantitative Echtzeit-PCR.....	54
2.5.14.1.	cDNA-Synthese.....	54
2.5.14.2.	qPCR	54
2.6.	Biochemische Untersuchungen.....	56
2.6.1.	Kaffeesäure O-Methyltransferase (COMT) aus <i>Linum album</i> und <i>Linum nodiflorum</i>	56
2.6.1.1.	Proteinexpression	56
2.6.1.2.	Proteinaufreinigung	56
2.6.2.	Mutanten der Coniferylalkohol 9-O-Methyltransferase.....	57
2.6.2.1.	Proteinexpression	57
2.6.2.2.	Proteinaufreinigung	58
2.6.3.	Methyltransferasen LnMT3 und LnMT3s	58
2.6.3.1.	Proteinexpression	58
2.6.3.2.	Proteinaufreinigung	58
2.6.4.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
2.6.5.	Proteinbestimmung nach Bradford	60
2.6.6.	Enzymtests mit Mutanten der Coniferylalkohol 9-O-Methyltransferase.....	60
2.6.6.1.	Herstellung des Coniferylalkohol-9-Methylethers (Ca9Me).....	60
2.6.6.2.	Enzymtests	61
2.6.7.	Enzymtests mit Kaffeesäure O-Methyltransferasen.....	62
2.6.7.1.	Substrate.....	63
2.6.7.2.	Dünnschichtchromatographie.....	63
2.6.7.3.	Enzymtests LaCOMT	64
2.6.8.	Enzymtests mit den Methyltransferasen LnMT3 und LnMT3s	65

2.6.8.1. Substrate:.....	66
2.6.9. LC-MS.....	66
3. Ergebnisse und Diskussion	68
3.1. Anlegen von Kallus- und Suspensionskulturen.....	68
3.2. Lignanextraktion.....	68
3.3. Elicitierung	70
3.3.1. <i>Linum nodiflorum</i> Suspensionskultur 1	70
3.3.2. <i>Linum nodiflorum</i> Suspensionskultur 2.....	73
3.4. Kulturcharakterisierung	75
3.4.1. Mediumsparameter	75
3.4.2. Zellparameter.....	76
3.4.3. Lignangehalt	77
3.4.4. Proteingehalt.....	79
3.4.5. PAL-Aktivität	80
3.4.6. Genexpressionsanalyse verschiedener Methyltransferasen	81
3.5. Cytochrom-P450-Enzyme	83
3.6. Coniferylalkohol 9-O-Methyltransferase.....	84
3.6.1. Herstellung des Coniferylalkohol 9-O-Methylether-Standards	87
3.6.2. Ca9OMT-Mutante C271A.....	87
3.6.3. Ca9OMT-Mutante C271S.....	90
3.6.4. Ca9OMT-Mutante D272N.....	94
3.6.5. Ca9OMT-Mutante Y162F	96
3.7. Kaffeesäure O-Methyltransferase.....	97
3.7.1. Kaffeesäure O-Methyltransferase aus <i>Linum nodiflorum</i>	97
3.7.2. Kaffeesäure O-Methyltransferase aus <i>Linum album</i>	101
3.7.2.1. Molekularbiologie	102
3.7.2.2. Identifizierung des Substrats	104
3.7.2.3. Temperaturoptimum.....	106
3.7.2.4. pH-Optimum.....	107

3.7.2.5. Enzymkinetik	107
3.7.3. Vergleich der Kaffeesäure O-Methyltransferasen aus <i>L. nodiflorum</i> und <i>L. album</i>	111
3.8. Methyltransferasen LnMT3 und LnMT3s	113
3.8.1. Molekularbiologie	113
3.8.2. Identifizierung des Substrats	116
Zusammenfassung	123
Summary	125
4. Literaturverzeichnis	127
5. Anhang	135
5.1. Abkürzungen	135
5.2. Chromatogramme	137
5.3. Vektorkarten	141
5.3.1. pDrive Cloning Vector	141
5.3.2. pRACE	142
5.3.3. pET15b	143
5.3.4. pRSET C	144

1. EINLEITUNG

1.1. LINUM-ARTEN

Die Pflanzen der Gattung *Linum* gehören zur Familie der Linaceae (Leingewächse) bzw. der Unterfamilie Linoideae. Innerhalb der Familie Linaceae bildet diese Gattung die größte Gruppe mit ca. 180 verschiedenen Spezies (McDill et al., 2009; McDill und Simpson, 2011), die weltweit verbreitet sind. Die Gattung wurde aufgrund verschiedener Merkmale, wie dem Aussehen der Blüten und Blätter, in verschiedene Sektionen eingeteilt. Dazu gehören die Sektionen *Linum*, *Dasylinum*, *Linastrum* bzw. *Linopsis*, *Cathartolinum* und *Syllinum* (Winkler, 1931; Ockendon und Walters, 1968; Diederichson und Richards, 2003; Dressler et al., 2014). Bekanntester Vertreter der Gattung ist *Linum usitatissimum* (siehe Abbildung 1) aus der Sektion *Linum*. Der Echte Lein oder Flachs ist weltweit verbreitet und dient als Material zur Herstellung von Textilien. Neben der Produktion von Leinöl kommen die Samen dieser Pflanze häufig in der Phytotherapie zum Einsatz. Die Leinsamen (Abbildung 2) werden vorwiegend bei chronischer Obstipation eingesetzt, können aber auch bei Reizdarmsyndrom (Colon irritable), Divertikulitis und bei Gastritiden oder Enteritiden angewendet werden. Für die Wirkung verantwortlich sind die enthaltenen neutralen und sauren Schleimpolysaccharide und unlösliche Ballaststoffe. Diese Stoffe wirken durch Quellung anregend auf die Darmperistaltik und bilden zudem eine unterstützende Schleimschicht.



ABBILDUNG 1

Linum usitatissimum (aus Heilpflanzenpraxis heute (Bäumler, 2007))



ABBILDUNG 2

Leinsamen (aus Mikroskopischer Farbatlas pflanzlicher Drogen (Rahfeld, 2017))

Leinsamen enthalten außerdem Lignane, die auch biologische Aktivität zeigen, wie z.B. Secoisolariciresinol und Matairesinol und ihre Glycoside. Im Körper werden die Lignane durch Darmbakterien zu den hormonähnlichen Phytoestrogenen Enterodiol bzw. Enterolacton umgewandelt. Diese besitzen einen hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum, insbesondere bei hormonabhängigen Tumoren (Adlercreutz, 1995; Thompson, 1998).

Für die vorliegende Arbeit wurden Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum*, *Linum album* und *Linum flavum* untersucht, die innerhalb der Gattung der Sektion Syllinum zugeordnet sind. *Linum nodiflorum* (Knotenblütiger Lein) (Abbildung 3) ist oft im mediterranen Raum anzutreffen. Es handelt sich um eine einjährige Pflanze, die gelbe Blüten hat und 10-50 cm groß werden kann. Der Weiße Lein, *Linum album*, ist ebenfalls eine einjährige Pflanze (Abbildung 4). Sie besitzt weiße Blüten und ist vorwiegend im iranischen Raum verteilt. Bei der letzten Pflanze handelt es sich um *Linum flavum*, den Gelben Lein, der vor allem in Europa und Asien wächst. Bezüglich der Inhaltsstoffe sind neben fettem Öl auch Lignane zu finden. Interessant ist unter anderem der Gehalt an Aryltetralinlignan, die z.B. in der Krebstherapie Anwendung finden (siehe 1.3.4). Alle beschriebenen *Linum*-Arten produzieren diese Lignane. Die Literatur zeigt, dass Suspensionskulturen von *Linum album* (Smolny et al., 1992, 1998) vor allem Podophyllotoxin produzieren können, während bei *L. nodiflorum* (Konuklugil et al., 1999) und *L. flavum* (Wichers et al., 1990, 1991; van Uden et al., 1990) hauptsächlich 6-Methoxypodophyllotoxin akkumuliert wird.



ABBILDUNG 3

Linum nodiflorum (zur Verfügung gestellt von M. Petersen)



ABBILDUNG 4

Linum album (Rechinger, 1974)

1.2. ZELLKULTUREN

Pflanzliche Zellkulturen können zu verschiedenen Zwecken angelegt werden. Sie dienen einerseits der Erforschung unbekannter Biosyntheseschritte von Naturstoffen. Andererseits werden sie zur biotechnologischen Produktion von Sekundärstoffen oder durch Transformation auch zur Herstellung von Antikörpern bzw. Proteinen eingesetzt (Alfermann und Petersen, 1995; Hellwig et al., 2004; Wilson und Roberts, 2012).

Zellkulturen können aus allen Pflanzenorganen, d.h. Blättern, Stängeln oder Wurzeln und aus keimenden Samen angelegt werden. Die Objekte werden nach Oberflächensterilisation in Stücke geschnitten und auf ein Medium gesetzt, welches Hormone enthält. Es bilden sich undifferenzierte Zellen, die Kallus genannt werden. Bringt man diese Zellen in flüssiges Medium, bilden sich kleinere Zellaggregate, die unter Schütteln mit genügend Sauerstoff versorgt werden. Diese Kulturen werden als Zellsuspensionskulturen bezeichnet (siehe Abbildung 5). Zur Erhaltung der Kulturen werden sie regelmäßig auf bzw. in neues Medium überführt.

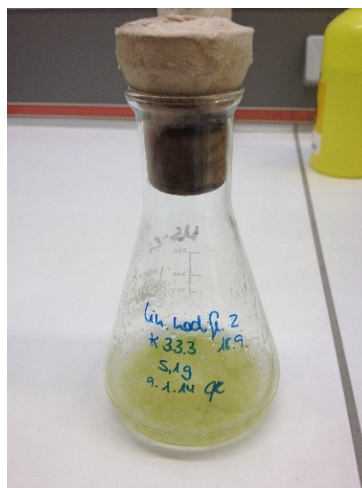


ABBILDUNG 5

Zellsuspensionskultur von *Linum nodiflorum*

Vorteile der pflanzlichen Zellkulturen gegenüber den differenzierten Pflanzen sind z.B. die Unabhängigkeit von Wetterbedingungen und das schnellere Wachstum. Trotz der Vorteile treten aber häufig Probleme mit einer nachlassenden oder niedrigen Produktion der gewünschten Produkte auf. Zudem gibt es Zellkulturen, die keine der Naturstoffe enthalten, die in der eigentlichen Pflanze zu finden sind. Diese Tatsache macht eine kommerzielle Nutzung von Zellkulturen zur Gewinnung bestimmter Stoffe zu einer Herausforderung, dennoch konnte dieses Ziel für einige Substanzen erreicht werden. Zu den Beispielen bereits erfolgreich kommerziell genutzter pflanzlicher Zellkulturen gehören u.a. *Lithospermum*

erythrorhizon zur Herstellung von Shikonin oder die Produktion von Paclitaxel aus Kulturen von *Taxus chinensis* v. *marei* durch Phyton Biotech (<https://phytonbiotech.com/apis/paclitaxel/>) (Phyton Biotech); (Alfermann und Petersen, 1995; Kolewe et al., 2008; Weathers et al., 2010; Wilson und Roberts, 2012). In 2012 wurde zudem von der FDA ein rekombinantes Protein (Taliglucerase alfa, Elelyso®) zugelassen, welches aus pflanzlichen Zellkulturen gewonnen wird (<http://protalix.com>, Protalix Biotherapeutics). Elelyso® wird zur Enzymsubstitutionstherapie bei Morbus Gaucher eingesetzt.

1.3. LIGNANBIOSYNTHESE

In der Pflanzenwelt sind Lignane weit verbreitet und dienen in der Pflanze vor allem dem Schutz vor Schädlingen (Lewis und Davin, 1999; Harmatha und Dinan, 2003; Gao et al., 2004). Von Bedeutung für die Forschung sind Lignane durch ihre biologische Aktivität (siehe 1.3.4). Als Lignane bezeichnet man Phenylpropanoide, die einen dimeren C₆C₃-Körper besitzen und über C8-C8' gekoppelt sind. Phenylpropandimere, bei denen eine Verknüpfung der C₆C₃-Körper nicht über diese C8-C8'-Kopplung erfolgt, nennt man Neolignane. Zusätzlich existieren Oxyneolignane, bei der die Verknüpfung der Monomere nicht über ein Kohlenstoff-Atom, sondern über ein Ether-Sauerstoff-Atom auftritt (Moss, 2000).

Lignane können allgemein in acht verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Diese sind die Arylnaphthalen- (z.B. Dehydropodophyllotoxin), Aryltetralin- (z.B. Podophyllotoxin), Dibenzocyclooctadien- (z.B. Steganacin), Dibenzylbutan- (z.B. Secoisolariciresinol), Dibenzylbutyrolactol- (z.B. Cubebin), Dibenzylbutyrolacton- (z.B. Matairesinol), Furan- (z.B. Lariciresinol) und Furofuran-Lignane (z.B. Pinoresinol) (Umezawa, 2003). Interessant sind vor allem das Aryltetralinlignan Podophyllotoxin und seine Derivate, die medizinisch angewendet werden (siehe 1.3.4). Die Biosynthese von Podophyllotoxin kann in zwei Abschnitte geteilt werden. Diese sind die frühen und späten Schritte der Biosynthese. Im Fall der frühen Schritte konnten alle teilnehmenden Enzyme und die Reihenfolge der Reaktionen aufgeklärt werden. Die späten Schritte sind jedoch noch nicht komplett bekannt und sind deshalb für weitere Untersuchungen von Interesse. In den folgenden Kapiteln werden die beiden Abschnitte ausführlich dargestellt.

1.3.1. Frühe Schritte der Lignanbiosynthese

Ausgangspunkt der Biosynthese von Aryltetralinlignanen ist Coniferylalkohol, welches aus dem allgemeinen Phenylpropanoid-Biosyntheseweg stammt. Dieser startet mit der Umsetzung

der Aminosäure L-Phenylalanin zu *t*-Zimtsäure durch die Phenylalanin Ammoniak-Lyase. Nach der Bildung von 4-Cumarsäure, katalysiert durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase, wird dieses in mehreren Schritten u.a. durch die 4-Cumarat CoA-Ligase und die Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase zu Caffeoyl-CoA umgesetzt. Anschließend erfolgt die Umwandlung zu Feruloyl-CoA durch die Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase und dann wird über Coniferaldehyd mittels der Cinnamoyl-CoA Reduktase und der Cinnamylalkohol Dehydrogenase Coniferylalkohol hergestellt (Dixon et al., 2001; Ferrer et al., 2008; Umezawa, 2010).

Der gebildete Coniferylalkohol wird zu Beginn der Lignanbiosynthese unter Dimerisierung zu (+)-Pinoresinol (Abbildung 6). Dieser Reaktionsschritt wird durch eine Oxidase und ein dirigierendes Protein katalysiert. Die Oxidase ist für die Radikalbildung zuständig, während das dirigierende Protein für eine stereospezifische Kopplung der Coniferylalkohol-Monomere sorgt. Das dirigierende Protein wurde erstmals in *Forsythia intermedia* entdeckt, isoliert und sequenziert (Davin et al., 1997; Gang et al., 1999). Die nächsten beiden Reaktionen werden von der Pinoresinol/Lariciresinol-Reduktase (PLR) durchgeführt. Dabei entsteht zunächst das (+)-Lariciresinol und danach das (-)-Secoisolariciresinol. Auch hierbei handelt es sich um stereospezifische Reaktionen, die ebenfalls zuerst in *Forsythia*-Species nachgewiesen wurden (Chu et al., 1993; Dinkova-Kostova et al., 1996). Dieses Enzym konnte auch aus *Linum album* und *Linum usitatissimum* isoliert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die PLR aus *Linum usitatissimum*, im Gegensatz zu der PLR aus *Linum album* und *Forsythia intermedia*, zu den Produkten (-)-Lariciresinol bzw. (+)-Secoisoresinol führt (Heimendahl et al., 2005). (-)-Secoisolariciresinol wird im anschließenden stereospezifischen Reaktionsschritt durch die NAD-abhängige Secoisolariciresinol Dehydrogenase zu (-)-Matairesinol umgesetzt. Erstmals wurde dieses Enzym in *Forsythia intermedia* entdeckt und isoliert. Zudem konnte das Enzym aus *Podophyllum peltatum* isoliert werden (Umezawa et al., 1991; Xia et al., 2001). In *Linum flavum* konnte ein Ablauf der frühen Schritte der Lignanbiosynthese nachgewiesen werden, der dem aus *Forsythia intermedia* entspricht (Xia et al., 2000).

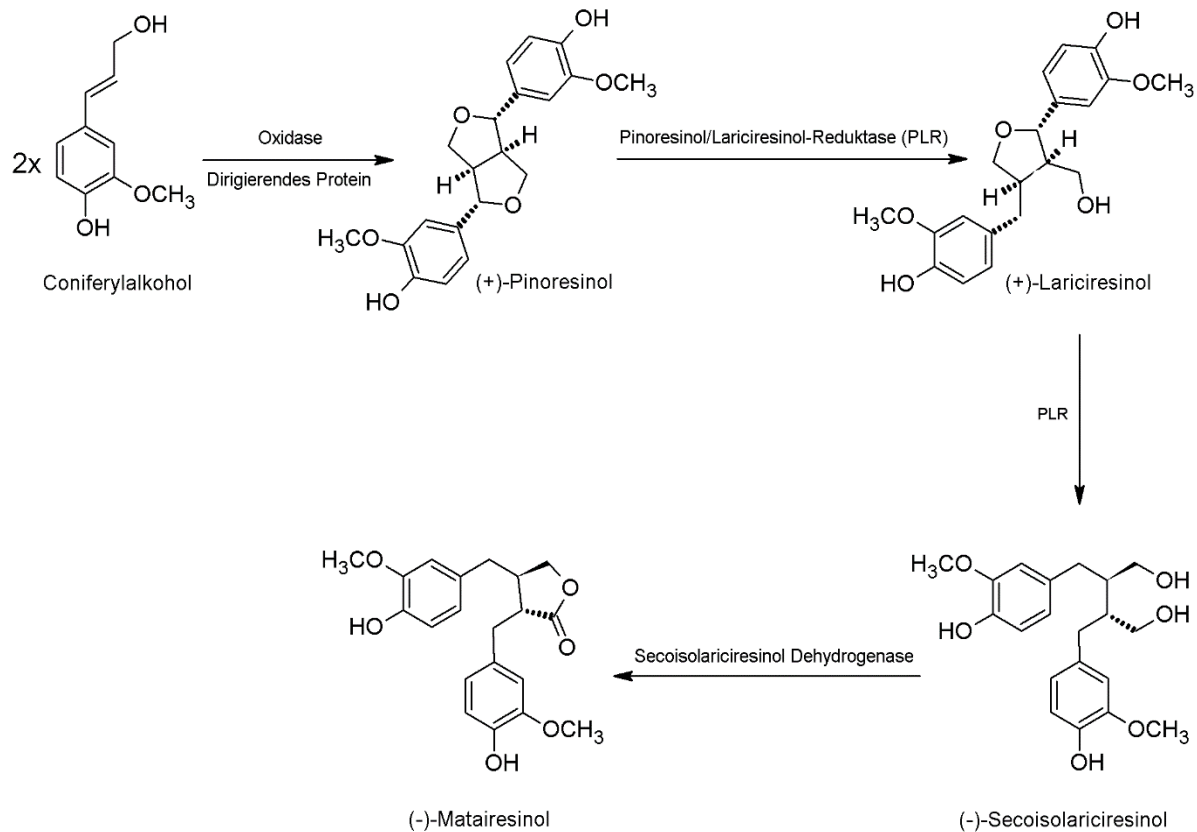


ABBILDUNG 6

Ablauf der Reaktionen der frühen Schritte der Lignanbiosynthese mit den beteiligten Enzymen.

1.3.2. Späte Schritte der Lignanbiosynthese

Betrachtet man die späten Schritte der Lignanbiosynthese (Abbildung 7), sind die meisten Reaktionen unbekannt. Nur ein paar Enzyme konnten bisher identifiziert werden, aber der generelle Ablauf der Synthese von Podophyllotoxin oder 6-Methoxypodophyllotoxin ist unklar. Hinweise auf eine Reihenfolge der Reaktionen lieferten verschiedene Fütterungsexperimente. Durch Fütterung von radioaktiv markiertem Matairesinol bzw. Yatein an *Podophyllum*-Arten konnte gezeigt werden, dass diese Vorstufen von Podophyllotoxin sind (Kamil und Dewick, 1986b; Broomhead et al., 1991). Mit dem Füttern von markiertem Desoxypodophyllotoxin (DOP) an *Podophyllum hexandrum* wurde dieses ebenfalls als Vorstufe von Podophyllotoxin und β -Peltatin identifiziert (Jackson und Dewick, 1984b; Kamil und Dewick, 1986a). Im Fall von 6-Methoxypodophyllotoxin (MPTOX) wurde für *Linum flavum* beschrieben, dass dieses nicht direkt aus Podophyllotoxin gebildet werden kann, sondern DOP ebenfalls eine Vorstufe von MPTOX ist (van Uden et al., 1993; van Uden et al., 1995). Sakakibara et al. (2003) zeigte in *Anthriscus sylvestris*, dass radioaktiv markiertes Matairesinol über Thujaplicatin, 5-Methylthujaplicatin und 4,5-Dimethylthujaplicatin in Yatein umgesetzt wird. Zudem beschrieben Sakakibara et al. (2003) einen zweiten Reaktionsweg von Matairesinol über

Pluviatolid zu Bursehernin (5'-Desmethoxyypatein). In *Podophyllum hexandrum* und *Podophyllum peltatum* wurden Cytochrom P450-Enzyme gefunden und isoliert, welche für die Umsetzung zu Pluviatolid verantwortlich sind. Diese Enzyme CYP719A23/24 katalysieren die Bildung des Methylendioxy-Rings (Marques et al., 2013). Die Identifizierung der CYP-Enzyme und des Biosynthesewegs zu Desmethylepipodophyllotoxin (Lau und Sattely, 2015); siehe Abschnitt 1.3.3) stimmen mit den Ergebnissen von Sakakibara et al. (2003) überein.

Für Matairesinol wurde noch eine weitere Reaktion beobachtet, die nicht direkt an der Biosynthese von Podophyllotoxin beteiligt ist. Dabei handelt es sich um eine Methylierung, die entweder zu Arctigenin oder Isoarctigenin führt (Abbildung 8). Matairesinol O-Methyltransferasen wurden aus *Carthamus tinctorius* (CtMROMT) und *Anthriscus sylvestris* (AsMROMT) isoliert und bilden Arctigenin, während die isolierte Methyltransferase aus *Forsythia koreana* (FkMROMT) Isoarctigenin bildet (Umezawa et al., 2013; Ragamustari et al., 2014).

Eine weitere Methyltransferase, die aus *Anthriscus sylvestris* isoliert und charakterisiert wurde, ist die Thujaplicatin O-Methyltransferase (AsTJOMT). Dieses Enzym setzt Thujaplicatin zu 5-O-Methylthujaplicatin um (Ragamustari et al., 2013).

Die Umsetzung von DOP zu β -Peltatin durch die Hydroxylierung an Position 6 wird durch ein NADPH-abhängiges Cytochrom-P450-Enzym durchgeführt. Die DOP 6-Hydroxylase wurde mit Hilfe von Mikrosomenpräparationen aus Suspensionskulturen von *Linum flavum*, *Linum nodiflorum* und *Linum album* charakterisiert (Molog et al., 2001; Kuhlmann et al., 2002; Kuhlmann, 2004; Federolf et al., 2007). Die Hydroxylase konnte bei *Linum album* nur in Kulturen nachgewiesen werden, die MPTOX akkumulierten. Federolf et al. (2007) zeigte zudem, dass die Hydroxylierung von DOP zu Podophyllotoxin (DOP 7-Hydroxylase) und von β -Peltatin-A-Methylether zu MPTOX möglicherweise durch dasselbe Enzym katalysiert wird. Außerdem zeigten Federolf et al. (2007) durch Inhibitionstests mit der DOP 6-Hydroxylase, dass es sich bei der DOP 7-Hydroxylase vermutlich nicht um ein Cytochrom-P450-Enzym handelt.

Zu den bereits identifizierten Enzymen gehört auch die β -Peltatin O-Methyltransferase (POMT). Diese katalysiert die Methylierung von β -Peltatin an Position 6 zu β -Peltatin-A-Methylether. Nachgewiesen und charakterisiert wurde das Enzym erstmals in Proteinextrakten von *Linum nodiflorum* (Kranz und Petersen, 2003). Eine weitere POMT wurde auch in *Linum album* gefunden und charakterisiert (Federolf et al., 2007).

In *Linum nodiflorum* wurde von Berim et al. (2008) eine Glucosyltransferase nachgewiesen, die in der Lage war, den Glucose-Rest an die OH-Gruppen in Position 7 von Podophyllotoxin, MPTOX und 5'-Demethoxy-6-methoxypodophyllotoxin zu übertragen. Die Transferase ist abhängig von Uridindiphosphat-Glucose und dient der Reduktion der Toxizität der Lignane,

die dann aufgrund der besseren Wasserlöslichkeit in der Vakuole gespeichert werden können (Berim et al., 2008).

Für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse ist die Identifizierung von Methyltransferasen, da sie an mehreren unbekannten Reaktionen beteiligt sind.

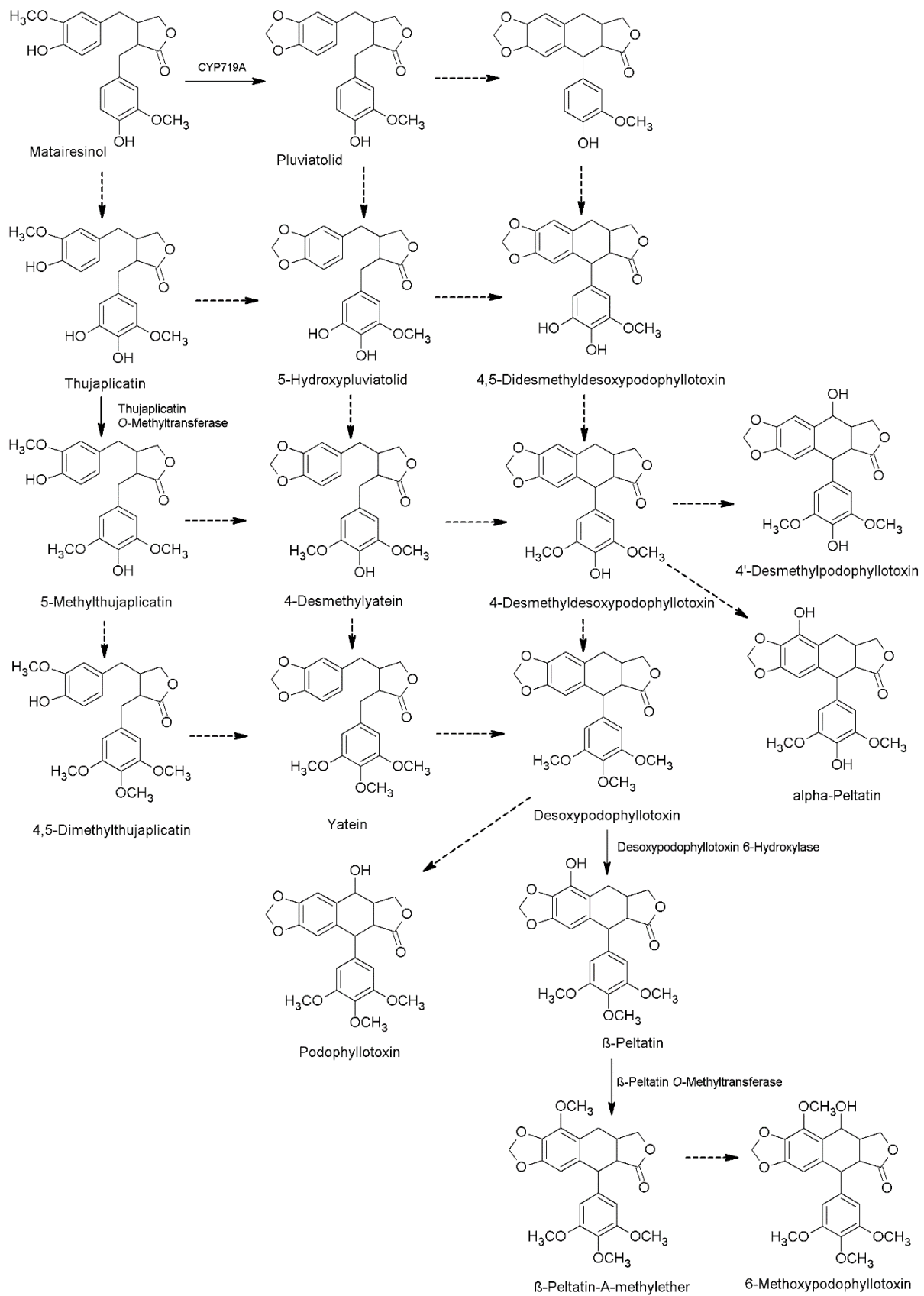


ABBILDUNG 7

Übersicht der späten Schritte der Lignanbiosynthese. Bekannte Reaktionen werden mit durchgehenden Pfeilen und unbekannte mit gestichelten Pfeilen dargestellt.

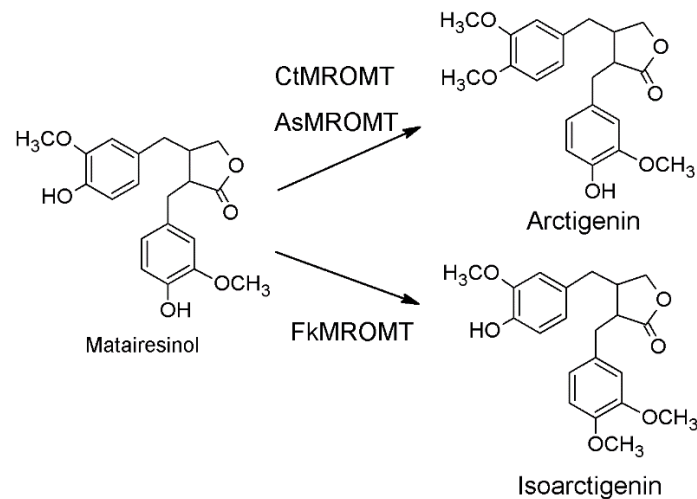


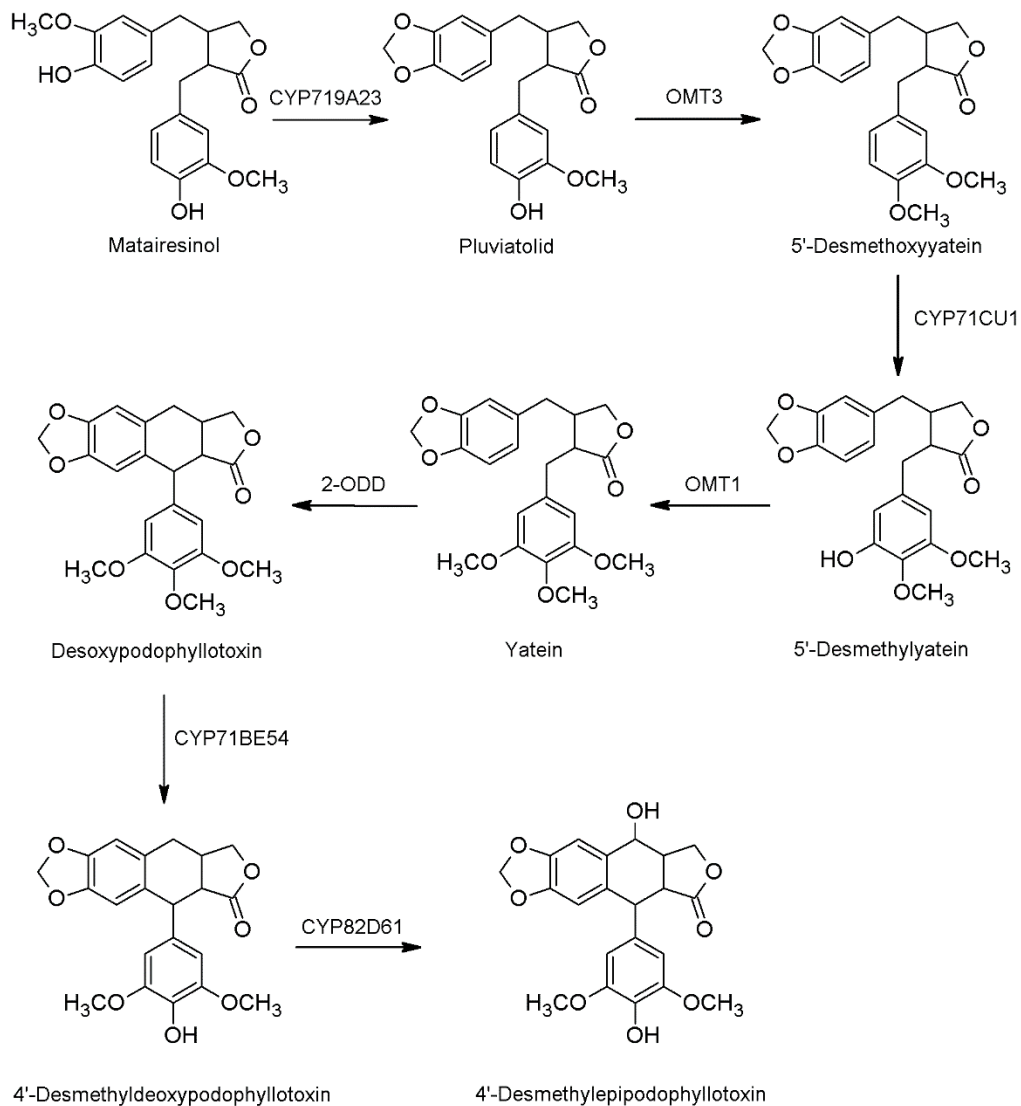
ABBILDUNG 8

Methylierung von Matairesinol durch Methyltransferasen aus *Carthamus tinctorius* (CtMROMT), *Anthriscus sylvestris* (AsMROMT) und *Forsythia koreana* (FkMROMT).

1.3.3. Biosynthese zu Desmethylepipodophyllotoxin

In einem Artikel von Lau und Sattely (2015) wurden mehrere Enzyme aus *Podophyllum hexandrum* identifiziert, die an der Bildung von 4'-Desmethylepipodophyllotoxin beteiligt sind (Abbildung 9). Bei 4'-Desmethylepipodophyllotoxin handelt es sich um eine direkte Vorstufe der Krebsmedikamente Etoposid und Teniposid (siehe 1.3.4). Die Enzyme wurden in *Podophyllum hexandrum* über Transkriptom-Analyse gefunden und in *Nicotiana benthamiana* exprimiert.

Ausgehend von Matairesinol und dem bereits beschriebenen Cytochrom P450-Enzym CYP719A23 (Marques et al., 2013), welches Pluviatolid produziert, wurde die Methyltransferase OMT3 entdeckt, die dieses Produkt zu 5'-Desmethoxyyatein umsetzen kann. Die Hydroxylierung von 5'-Desmethoxyyatein zu 5'-Desmethylyatein wurde von dem Cytochrom P450-Enzym CYP71CU1 katalysiert und die anschließende Methylierung durch OMT1 durchgeführt. Das entstandene Yatein wurde durch Ringschluss zu Desoxypodophyllotoxin umgewandelt. Dieser Reaktionsschritt wurde durch eine 2-Oxoglutarat- und Fe(II)-abhängige Dioxygenase (2-ODD) ausgeführt. Die Demethylierung von Desoxypodophyllotoxin durch das Cytochrom P450-Enzym CYP71BE54 zu 4'-Desmethyl-desoxypodophyllotoxin ist der nächste Schritt der Biosynthese. Der letzte Schritt ist die Hydroxylierung, katalysiert durch das Cytochrom P450-Enzym CYP82D61, zum Endprodukt 4'-Desmethylepipodophyllotoxin. Bis jetzt ist dies die erste und einzige Beschreibung eines solchen Biosynthesewegs zu diesem Produkt.

**ABBILDUNG 9**

Biosyntheseweg von Matairesinol zu 4'-Desmethylepipodophyllotoxin nach Lau und Sattely (2015).

1.3.4. Podophyllotoxin

Lignane besitzen zahlreiche biologische Eigenschaften. Betrachtet man die Gruppe der Aryltetralinlignane, ist vor allem Podophyllotoxin (Abbildung 10) von Interesse, da es medizinisch angewendet wird. Podophyllotoxin (PTOX) wird aus *Podophyllum hexandrum* und *Podophyllum peltatum* (beide Berberidaceae) gewonnen, wobei gezeigt wurde, dass die Rhizome von *P. hexandrum* mehr PTOX enthalten (Jackson und Dewick, 1984a). Der im Himalaya-Gebiet wachsende *P. hexandrum* wurde von der „Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES)“ auf die Liste der gefährdeten Arten gesetzt, bei denen der Handel kontrolliert werden muss (Appendix II). Neben *Podophyllum*-Arten sind Aryltetralinlignane aber auch in verschiedenen Pflanzen anderer Familien, wie z.B.

Linaceae, Cupressaceae, Apiaceae oder Polygalaceae zu finden (Imbert, 1998; Gordaliza et al., 2004).

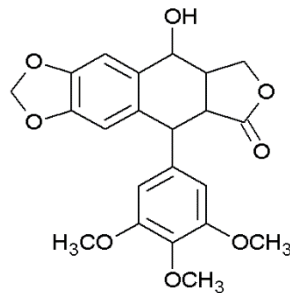


ABBILDUNG 10

Struktur des Lignans Podophyllotoxin

Podophyllotoxin wird in Form einer 0,5%igen Lösung (Condylox®) oder einer 0,15%igen Creme (Wartec®) zur Behandlung von Condylomata acuminata (Feigwarzen) eingesetzt.

Ursprünglich eingesetzt wurde ein Extrakt aus dem Rhizom von *Podophyllum*-Arten, das sogenannte Podophyllin oder Podophyllumharz. Dieser Extrakt enthielt hauptsächlich Podophyllotoxin und wurde in verschiedene Arzneibücher u.a. auch in den Deutschen Arzneimittel Codex (DAC) aufgenommen. Die Monographie wurde aus dem DAC 2005 gestrichen, da das Harz nicht mehr verfügbar war und zudem die Therapie mit dem Harz als obsolet gilt.

Aufgrund der cytotoxischen Aktivität von PTOX ist ein Einsatz in der Krebstherapie denkbar, aber die Toxizität ist bei der innerlichen Anwendung zu hoch (Imbert, 1998). Deshalb kommen die Derivate des PTOX Etoposid und Teniposid in der Krebstherapie zum Einsatz. Bei beiden handelt es sich um Glykoside, die aus PTOX partialsynthetisch hergestellt werden (Abbildung 11).

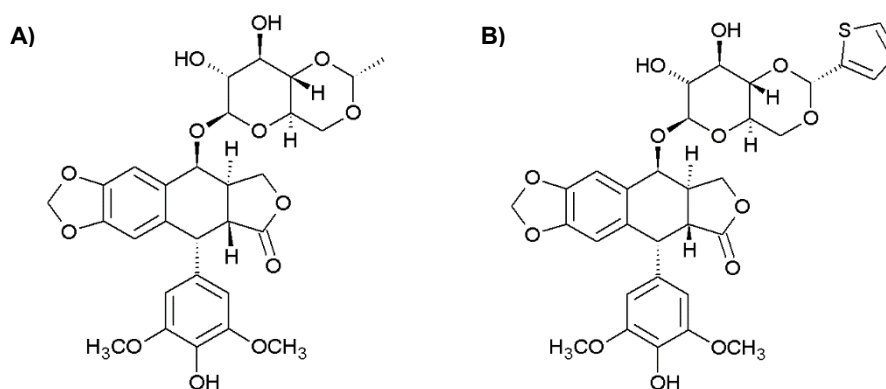


ABBILDUNG 11

Strukturen der Podophyllotoxin-Derivate Etoposid (A) und Teniposid (B)

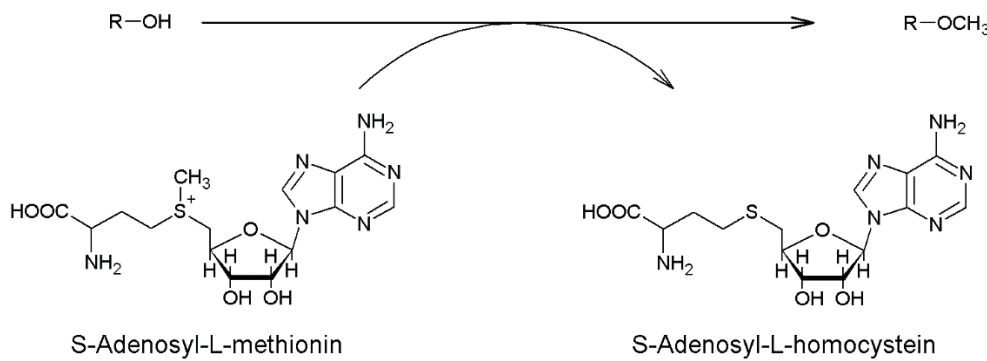
Teniposid wurde gegen akute Leukämien, Lymphome, ZNS-Tumore und bei Harnblasenkarzinom eingesetzt. Anwendungsgebiete von Etoposid (z.B. Riboposid®, Vepesid®) sind Bronchial-, Hoden- und Ovarialkarzinome und Lymphome. Für eine bessere Löslichkeit von Etoposid wird dieses phosphoryliert. Bei Etoposidphosphat (Etopophos®) handelt es sich um ein Prodrug, das im Körper durch die alkalische Phosphatase zu Etoposid umgewandelt wird.

Der Reaktionsmechanismus von PTOX läuft über eine Hemmung der Mitose ab. Dabei verhindert PTOX die Polymerisation von Tubulin zu Microtubuli, und damit können in der Metaphase der Mitose die Chromosomen nicht voneinander getrennt werden. In der Folge stirbt die Zelle ab. Die Derivate des PTOX besitzen einen anderen Reaktionsmechanismus. Bei ihnen handelt es sich um Inhibitoren der DNA Topoisomerase II. Topoisomerase II übernimmt bei der Replikation die Aufgabe des Entwindens der DNA durch Spalten der DNA-Stränge und verschließt diese auch wieder. Die Hemmung der Aktivität dieses Enzyms beruht auf der Bindung und der damit verbundenen Stabilisierung des Topoisomerase II-DNA-Komplexes. Es bilden sich DNA-Strangbrüche, die nicht wieder verknüpft werden können und der Zelltod tritt ein (Petersen und Alfermann, 2001; Gordaliza et al., 2004).

1.4. METHYLTRANSFERASEN

Methyltransferasen sind weit verbreitet und erfüllen Aufgaben in zahlreichen Organismen, neben Bakterien und Pilzen auch in Pflanzen und Säugetieren. Im Menschen spielt, z.B. die Catechol O-Methyltransferase eine wichtige Rolle bei dem Abbau von Neurotransmittern, wie Dopamin.

Man kann zwischen C-, N-, O- und S-Methyltransferasen unterscheiden, bezogen auf das jeweils methylierte Atom. Für die stattfindende Reaktion ist ein Methylgruppendonor nötig, der die Methylgruppe liefert, die auf das Substrat übertragen wird. Ein häufig gebrauchter Methylgruppendonor ist S-Adenosyl-L-methionin (SAM; s. Abbildung 12), aber auch andere Substanzen sind zur Bereitstellung von Methylgruppen in der Lage, z.B. das 5-Methyltetrahydrofolat in der Methionin-Synthese.

**ABBILDUNG 12**

Methylierung eines Substrats mit Hilfe des Methylgruppendonors SAM.

Für diese Arbeit sind vor allem O-Methyltransferasen von Interesse, da sie an mehreren Schritten der Lignanbiosynthese beteiligt sind.

Von Ibrahim et al. (1998) wurde eine Klassifikation von O-Methyltransferasen vorgeschlagen, die auf den Substratpräferenzen der Enzyme beruht. Dabei werden sie in die Gruppen A – D unterteilt und innerhalb dieser Gruppen nochmal untergliedert. In Gruppe A werden Methyltransferasen eingeordnet, die Phenylpropanoide umsetzen und zur Gruppe B gehören Flavonoid O-Methyltransferasen. Enzyme, deren Substrate Alkaloide sind, werden der Gruppe C zugeteilt und Gruppe D sind O-Methyltransferasen mit aliphatischen Substraten.

Eine Zuordnung der O-Methyltransferasen basierend auf der Größe der Proteine erfolgte bei Joshi und Chiang (1998). Hier werden die Methyltransferasen in zwei verschiedene Gruppen unterschieden. Bei den pflanzlichen O-Methyltransferasen I (PL-OMTI) besteht das Protein aus 231-248 Aminosäuren und hat eine Größe von ca. 24 kDa. Außerdem sind die Enzyme dieser Gruppe abhängig von Mg^{2+} -Ionen. Die PL-OMTII beinhaltet Mg^{2+} -unabhängige O-Methyltransferasen, die in etwa eine Größe von 40 kDa und eine Länge von 344-383 Aminosäuren besitzen.

Noel et al. (2003) beschrieb eine ähnliche Möglichkeit, O-Methyltransferasen einzuteilen. Dabei werden drei Methyltransferase-Typen unterschieden. Die Typ 1 Methyltransferasen übertragen eine Methylgruppe auf Phenylpropanoide, z.B. Flavonoide. Bei Typ 2 handelt es sich um die Mg^{2+} -abhängigen Methyltransferasen, die vor allem CoA-gebundene Substrate wie Caffeoyl-CoA umsetzen. In der dritten Gruppe werden Methyltransferasen zusammengefasst, die in der Lage sind, Carbonsäuren zu methylieren (SABATH-Familie).

Nach Untersuchungen mehrerer bekannter Sequenzen von Methyltransferasen wurden von Ibrahim et al. (1998) und Joshi und Chiang (1998) verschiedene Bereiche identifiziert, die hoch konserviert sind (siehe Tabelle 1 und 2). Für die Bindung von SAM kamen Region I bzw. Motiv A-C in Frage. Die genaue Funktion der anderen Bereiche war unbekannt.

TABELLE 1

Konservierte Bereiche nach Ibrahim et al. (1998).

Region I (SAM)	LVDVGGGxG
Region II	GINFDLPHV
Region III	EHVGGDMF
Region IV	NGKVI
Region V	GGKERT

TABELLE 2

Konservierte Bereiche nach Joshi und Chiang et al. (1998)

Motiv A (SAM)	(V/I/L)(V/L)(D/K)(V/I)GGXX(G/A) für PL-OMTII: LVDVGGGXG
Motiv B (SAM)	(V/I/F)(A/P/E)X(A/P/G)DAXXXK(W/Y/F) für PL-OMTII: VPXXDAXXMKWI
Motiv C (SAM)	(A/P/G/S)(L/I/V)(A/P/G/S)XX(A/P/G/S)(K/R)(V/I)(E/I)(LIV) für PL-OMTII: ALPXXGKVIXXEXILP
Motiv I (PL-OMTII-spezifisches Motiv)	LDRXLRL
Motiv J (PL-OMTII-spezifisches Motiv)	IKGINFDLPHVI
Motiv K (PL-OMTII-spezifisches Motiv)	PGVEHVGGDMF
Motiv L (PL-OMTII-spezifisches Motiv)	GGKERTXXEFLA

Eine exaktere Beurteilung gelang mit der Identifizierung der Struktur verschiedener pflanzlicher O-Methyltransferasen (OMT). Bei diesen Methyltransferasen handelt es sich um eine Isoflavon OMT (IOMT), eine Chalkon OMT (ChOMT) und eine Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure 3/5-OMT aus *Medicago sativa* (Zubieta et al., 2001; Zubieta et al., 2002). Dabei bestätigte sich, dass das Motiv LVDVGGGXG an der SAM-Bindung beteiligt ist. Neben diesem Bereich sind auch Aminosäuren aus den Regionen II und III bzw. Motiv J und K für die Bindung von SAM verantwortlich. Die restlichen Bereiche nehmen an der Substratbindung teil oder sie besitzen eine katalytische Aktivität. Zubieta et al. (2001, 2002) konnten zudem den Reaktionsmechanismus der Enzyme aufklären. Aktiv sind alle drei Enzyme nur als Homodimere und sie besitzen einen katalytisch aktiven Histidin-Rest. Dieser Rest ist für die Deprotonierung der Hydroxyl-Gruppe des Substrats zuständig und anschließend kann das Substrat SAM nucleophil angreifen.

1.5. ZIEL DIESER ARBEIT

Um die Arbeiten für diese Dissertation auszuführen, war zunächst ein Anlegen von Kallus- und Suspensionskulturen aus Samen von *Linum nodiflorum* notwendig. Nach der erfolgreichen Etablierung von Suspensionskulturen sollte eine Untersuchung des Gehalts an Aryltetralinlignanen und anschließend eine Kulturcharakterisierung durchgeführt werden. Die Charakterisierung der Kultur sollte Aufschluss über den Verlauf der Produktion von Lignanen, die Aktivität und Expression verschiedener Enzyme geben.

In der Biosynthese von Aryltetralinlignanen sind zahlreiche Enzyme unbekannt, die an Methylierungsreaktionen beteiligt sein könnten. Deshalb sollte über die Isolierung von gDNA oder RNA aus Zellen von *L. nodiflorum*, *L. album* und *L. flavum* und anschließende PCR Methyltransferasen identifiziert werden, die Reaktionen der Biosynthese katalysieren. Dazu sollten die konservierten Bereiche bereits bekannter Methyltransferasen für die Primererstellung genutzt werden. Die isolierten Methyltransferasen sollten molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert werden.

Außerdem sollte untersucht werden, ob eine Umsetzung von Matairesinol in Pluviatolid durch Cytochrom P450-Enzyme, entsprechend der CYP719A23/24 aus *Podophyllum*-Arten, auch in *Linum*-Spezies nachgewiesen werden kann.

Eine weitere Aufgabe war die biochemische Charakterisierung der bereits bestehenden Coniferylalkohol 9-O-Methyltransferase-Mutanten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. GERÄTE- UND REAGENZLIENLISTEN

2.1.1. Geräte

Autoklaven	
Advantage Lab	AL02-01
Systec	VX-150
	VX-95
Brenner	
Schütt	Flammy S
Eismaschinen	
Scotsman	AF80
Manitowoc	
Elektrophoresekammern	
Biomed. Analytik GmbH	Agagel Mini Biometra
VWR	AGT-2
Biorad	
Peqlab	
Gefriertrockner	
B. Braun Biotech International	Christ Alpha 1-4
Geldokumentationssysteme	
Nippon Genetics	FAS-Digi
RS-Laborgeräte	Quick Store „plus“
HPLC	
Kontron	HPLC-Pump 422
	HPLC-Detektor 430
LDC-Analytical	SpectroMonitor 3200
Merck-Hitachi	L-6000 Pump
	D-2500 Chromato-Integrator
Thermo Electron Corporation	Spectra System SCM1000
	Spectra System SN4000
	Spectra System P4000

	Spectra System UV1000
Inkubator	
Jouan	
Inkubationsschüttler	
Gallenkamp	
Infors HT	Ecotron
Konduktometer	
HANNA	Conmet 1W
LC-MS	
Agilent	1260 series
Bruker Daltonics	MicroTOF-QIII with ESI Source
Magnetrührer	
Heidolph	MR 3001
Magnetrührer mit Heizplatte	
Heidolph	MR 1000
Mikrowelle	
Bosch	
Mixer	
Gemmy Industrial Corp	Vortex-Mixer VM-300
Scientific Industries	Vortex-Genie 2
PCR-Cycler	
Biorad	MyCycler thermal cycler
Eppendorf	Mastercycler gradient
pH-Meter	
Fisher Scientific	Accumet Basic
Photometer	
Analytik Jena	Specord 200 plus
Eppendorf	BioPhotometer
Pipetten	
Gilson	Pipetman Classic
Real-Time PCR System	
Thermo Scientific	PikoReal 96
Refraktometer	
A. Krüss Optronic GmbH	HR-18

Rotations-Vakuum-Konzentratoren	
Christ	RVC 2-18 CDplus
UniEquip	UniVapo 100 H
Rotationsverdampfer	
Büchi	Rotavapor RE120
Vacuubrand	Membranpumpe
Schüttelplatte	
Heidolph	Duomax 1030
Spannungsgeber	
Consort	E143
	E835
	EV2310
Sterilbank	
Gelman Instrument	Gelaire Laminar Air Flow Class 100
Microflow	Laminar Flow Workstation
Trockenschrank	
Memmert	U40
Ultraschallbad	
Bandelin	Sonorex Super RK 510 H
Ultraschallprozessor	
Dr. Hielscher GmbH	UP200S
Ultraturrax	
IKA Labortechnik	T 25 basic
UV-Lampe	
Bachofer GmbH	HL-6-KM
Waagen	
Kern	440-35A
	EG 300-3M
Mettler	H64
Ohaus	Explorer® Semi-Micro Balances
Sartorius	PT310
Wärmeblock/Schüttler	
Eppendorf	Thermomixer comfort

Wasseraufbereitung	
Millipore	Essential, Progard TS2, Vent Filter, 12 FO
Stakpure	OmniaPure
Wasserbäder	
B. Braun Biotech International	Thermomix ME
Julabo Labortechnik	
Zellkulturschüttler	
B. Braun Biotech International	Certomat SII
Infors AG	BB-306
Zentrifugen	
Eppendorf	Centrifuge 5415 D
Heraeus	Biofuge 17RS
Roth	Micro Centrifuge SD
Sigma	3-30KS
Thermo Scientific	Heraeus Fresco 17 Centrifuge
	Heraeus Pico 17 Centrifuge
	Sorvall RC6+

2.1.2. Reagenzien

Substanz	Firma
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Duchefa
4'-Demethylpodophyllotoxin	Laborsammlung
4-Cumarsäure	Roth
4-Demethylyatein	Laborbestand
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Fermentas, Roth
6-Benzylaminopurin (BAP)	Duchefa, Sigma
6-Methoxypodophyllotoxin	Laborsammlung
Acetonitril	Roth
Agar-Agar	C. E. Roeper GmbH
Agarose	Cambrex, Roth
Aktivkohle	Roth
Ameisensäure	Roth

Substanz	Firma
Ammoniumnitrat	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Roth
β -Glucosidase aus Mandeln	Roth
β -Peltatin	Laborsammlung
Borsäure	Roth
Bovine serum albumin (BSA)	Roth
Bromphenolblau	Merck
Butanol	Roth
Calciumchlorid Dihydrat	Roth
Catechin	Sigma
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth
Chloroform	Roth
Chlorogensäure	Roth
Chrysin	Roth
Cobalt-(II)-chlorid	Merck
Coniferylalkohol	Fluka, Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka, Serva
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka, Serva
Deoxypodophyllotoxin (DOP)	Laborsammlung
Diethyldithiocarbamat (DIECA)	Merck
Dimanin® C Pulver (Natriumdichlorisocyanuratdihydrat)	Bayer
Dimethylformamid	Merck
Dinatriumtetraborat-Decahydrat (Borax)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Eisen-(II)-sulfat Heptahydrat	Fluka
Eisessig	Roth
Eriodictyol	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	AppliChem
Ethylacetat	Roth, AppliChem
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth

Substanz	Firma
Galangin (3,5,7-Trihydroxyflavon)	Alfa Aesar
Glucose-6-phosphat	Merck
Glucose-6-phosphat Dehydrogenase	Fluka
Glycerin/Glycerol	Roth
Glycin	Merck, Roth
Guanidin-Hydrochlorid-Lösung (55% in Wasser – 5,75 M)	Roth
Guanidinthiocyanat	Roth
Hefeextrakt	Roth
Hesperetin	Roth
His-Bind-Resin	Novagen
Homoeriodictyol	Roth
Hydroxymatairesinol	Laborsammlung
Imidazol	Roth
Indol-3-essigsäure (IES)	Duchefa
Isoferulasäure	Roth
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roth
Kaempferol	Roth
Kaffeesäure	Serva, Alfa Aesar, Merck
Kaliumacetat	Acros organics
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Kaliumhydroxid	Merck
Kaliumiodid	Merck
Kaliumnitrat	Roth
Kinetin	Duchefa
Kupfer-(II)-sulfat Pentahydrat	Fluka
N-Lauroylsarcosine	Sigma
Luteolin-7-Glucosid	Roth
Lysozym aus Hühnereiweiß	Fluka
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth, Merck
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
Mangan-(II)-sulfat Pentahydrat	Duchefa

Substanz	Firma
Matairesinol	Laborsammlung
Methanol	Fisher Scientific, Roth
Methyljasmonat	Aldrich
myo-Inosit	Sigma
NADP	Biomol
NADPH	Roth
Naphthylessigsäure (NAA)	Duchefa
Naringenin	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat Dihydrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Natriummolybdat Dihydrat	Fluka
Naturstoffreagenz A	Roth
Nicotinsäure	Duchefa
N-Z-Amine® A	Sigma-Aldrich
PEG 4000	Roth
Petrolether 40°C - 60°C	Roth
Phenol (mit Citrat-Puffer gesättigt)	Sigma
Phenylalanin	Roth
o-Phosphorsäure 85%	Roth
Podophyllotoxin	Laborsammlung
Polyclar 10	ISP International Specialty Products
Polyvinylpyrrolidon MW 40000	Sigma
Pyridoxin x HCl	Duchefa
Quercetin Dihydrat	Roth
Resorcinol	Sigma
Roti-Load	Roth
Roti-Mark Plus/Standard/Tricolor	Roth
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth
Saccharose	Haushaltszucker (Diadem)
S-Adenosylmethionin (SAM)	Sigma, Carbosynth

Substanz	Firma
Salzsäure	Roth
SDS-Pellets	Roth
Sinapylalkohol	Laborsammlung
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Thiaminhydrochlorid	Roth
trans-Ferulasäure	Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Trypton/Pepton aus Casein	Roth
Xanthin	Sigma Aldrich
Xylencyanol	Fluka
Zimtsäure	Serva
Zink-(II)-sulfat Heptahydrat	Merck

2.1.3. Molekularbiologische Reagenzien und Kits

Reagenz/Kit	Firma
BL21(DE3)pLysS Competent <i>E. coli</i>	Novagen
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas
EZ Competent <i>E. coli</i>	Qiagen
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific
GoTaq® Flexi DNA Polymerase Kit	Promega
Nucleospin®-Extract II Kit	Macherey-Nagel
O'GeneRuler 1 kb Ladder ready-to-use	Thermo Scientific
PCR Cloning Kit	Qiagen
PEG 4000	Fermentas
PerfeCTa SYBR® Green SuperMix	Quanta
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase und 5x Phusion® HF Puffer	New England Biolabs (NEB)
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
qScript cDNA SuperMix	Quanta
Restriktionsenzym NdeI und CutSmart-Puffer	NEB

Reagenz/Kit	Firma
Restriktionsenzyme EcoRI, PstI, XhoI und Puffer	Fermentas/Thermo Scientific
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas/Thermo Scientific
RNase A	Fermentas
RNase H	Fermentas
SMARTer® RACE 5'/3' Kit	Clontech
SoluBL21™ Competent <i>E. coli</i>	Ambio
T4 DNA Ligase und 10x T4 DNA Ligase Puffer	Fermentas
Terminale Desoxynucleotidyltransferase (Tdt) und 5x Tdt-Puffer	Fermentas
TrueStart Taq Polymerase und 10x TrueStart Taq Puffer	Thermo Scientific

2.2. KULTURMEDIEN FÜR PFLANZEN

2.2.1. Stammlösungen

CB-Mikroelemente

Inhaltsstoffe	Konzentration
H ₃ BO ₃	300 mg/L
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	300 mg/L
MnSO ₄ x 5 H ₂ O	100 mg/L
KI	75 mg/L
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	25 mg/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25 mg/L
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	25 mg/L

CB-Vitamine

Inhaltsstoffe	Konzentration
Thiaminhydrochlorid	1000 mg/100 ml
Pyridoxin x HCl	100 mg/100 ml
Nicotinsäure	100 mg/100 ml

MS-Makroelemente

Inhaltsstoffe	Konzentration
KNO ₃	47,50 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	9,25 g/L
KH ₂ PO ₄ x H ₂ O	4,25 g/L
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	11,00 g/L
NH ₄ NO ₃	41,25 g/L

MS-Mikroelemente

Inhaltsstoffe	Konzentration
H ₃ BO ₃	620 mg/L
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	860 mg/L
MnSO ₄ x 5 H ₂ O	1690 mg/L
KI	83 mg/L
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	25 mg/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	2,5 mg/L
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	2,5 mg/L
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,78 g/L
Na ₂ x EDTA	3,73 g/L

MS-Vitamine

Inhaltsstoffe	Konzentration
Thiaminhydrochlorid	100 mg/100 ml
Pyridoxin x HCl	500 mg/100 ml
Nicotinsäure	500 mg/100 ml

2.2.2. Medienzusammensetzung

B5-Medium (Zusammensetzung für 1 L):

Inhaltsstoffe	Menge
KNO ₃ [250 g/L]	10 ml
MgSO ₄ [25 g/L]	10 ml
NaH ₂ PO ₄ [19,44 g/L]	10 ml
CaCl ₂ [15 g/L]	10 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ [13,4 g/L]	10 ml
FeSO ₄ + Na x EDTA FeSO ₄ x 7 H ₂ O [2,56 g/L] Na ₂ x EDTA x 2 H ₂ O [3,43 g/L]	10 ml
CB-Mikroelemente	10 ml
2,4-D [200 mg/L]	2 ml
Kinetin [20 mg/L]	0,5 ml
CB-Vitamine	1 ml
myo-Inosit	100 mg
Saccharose	20 g
Der pH-Wert wurde mit 0,5 N KOH auf 5,8 eingestellt.	

CB2-Medium (Zusammensetzung für 1 L):

Inhaltsstoffe	Menge
KNO ₃ [250 g/L]	10 ml
MgSO ₄ [25 g/L]	10 ml
NaH ₂ PO ₄ [17,2 g/L]	10 ml
CaCl ₂ [15 g/L]	10 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ [13,4 g/L]	10 ml
FeSO ₄ + Na x EDTA FeSO ₄ x 7 H ₂ O [2,56 g/L] Na ₂ x EDTA x 2 H ₂ O [3,43 g/L]	10 ml
IES [50 mg/L]	10 ml
2,4-D [200 mg/L]	10 ml
Kinetin [20 mg/L]	10 ml
NAA [50 mg/L]	10 ml
CB-Vitamine	1 ml
myo-Inosit	100 mg

Saccharose	20 g
N-Z-Amine	2 g
Der pH-Wert wurde mit 0,5 N HCl eingestellt.	

MSLi-Medium (Zusammensetzung für 1 L; Modifikation des Murashige-Skoog-Mediums):

Inhaltsstoffe	Menge
MS-Makroelemente	40 ml
MS-Mikroelemente	10 ml
MS-Vitamine	1 ml
Glycin [200 mg/100 ml]	1 ml
NAA [20 mg/100 ml]	2 ml
myo-Inosit	100 mg
Saccharose	30 g
Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von 0,5 N KOH auf 5,8 eingestellt.	

MSLf-Medium (nur für *Linum flavum*; Zusammensetzung für 1 L; Modifikation des Murashige-Skoog-Mediums):

Inhaltsstoffe	Menge
MS-Makroelemente	40 ml
MS-Mikroelemente	10 ml
MS-Vitamine	1 ml
Glycin [200 mg/100 ml]	1 ml
IES [50 mg/L]	2 ml
BAP [200 mg/L]	5 ml
myo-Inosit	100 mg
Saccharose	40 g
Der pH-Wert der Lösung wurde mit 0,5 N KOH auf 5,9 eingestellt.	

MSOH-Medium

Entspricht der Zusammensetzung von MS-Li ohne die Zugabe der Hormone.

Alle Medien wurden in flüssiger und fester Form verwendet. Zur Herstellung des festen Mediums wurde 0,9% Agar-Agar zugegeben. Die Medien wurden vor Benutzung autoklaviert.

2.3. NÄHRMEDIEN FÜR BAKTERIENKULTUREN

LB-Medium (Zusammensetzung für 1 L):

Inhaltsstoffe	Menge
Trypton/Pepton aus Casein	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Der pH-Wert wurde mit 0,5 N NaOH auf 7 eingestellt und das Medium vor Benutzung autoklaviert.	
Zugabe von 1% Agar um festes Medium zu erhalten.	

SOC-Medium (Zusammensetzung für 1 L):

Inhaltsstoffe	Menge
Trypton/Pepton aus Casein	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
KCl [1 M]	2,5 ml
Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf 7 eingestellt und auf ein Volumen von 990 ml gefüllt.	
Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml der sterilen MgCl ₂ -Lösung (1 M) und 20 ml sterile Glucose-Lösung (1 M) zugegeben.	

2.4. ARBEITEN MIT ZELLKULTUREN

2.4.1. Kallus- und Suspensionskulturen

Für die durchgeführten Experimente wurden Kallus- und Suspensionskulturen von *Linum album*, *Linum flavum* und *Linum nodiflorum* verwendet.

Die Suspensionskulturen von *Linum album* und *Linum flavum* waren zu Beginn der Arbeit schon vorhanden, während die Kulturen von *Linum nodiflorum* neu angelegt wurden. Das Wechseln des Mediums wurde wöchentlich bzw. für *Linum flavum* alle zwei Wochen in einer sterilen Umgebung durchgeführt. Dabei wurden 5 g Zellen mit einem perforierten Löffel entnommen und in neues flüssiges Medium gebracht.

Das Überimpfen der Kalluskulturen erfolgte alle vier Wochen. Dazu wurden Zellen entnommen und auf frisches festes Medium gesetzt.

2.4.2. Anlegen neuer Kallus- und Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum*

Die Samen von *Linum nodiflorum*, die zum Anlegen der neuen Kulturen verwendet wurden, stammten aus der Türkei.

Als Erstes wurden die Samen 1 min in 70%igem Ethanol inkubiert. Anschließend wurden sie 15 min in einer 10%igen Chlor-Lösung eingelegt und danach dreimal in sterilem Wasser gewaschen. Zur Keimung wurden die desinfizierten Samen auf festes MSH-Medium gesetzt. Sobald die Keimlinge groß genug waren, wurden sie in Stücke geschnitten und auf festes MSLi-Medium gegeben. Nach mehrmaligem Umsetzen war genug Kallus gewachsen, um die Zellen in flüssiges MSLi-Medium zu überführen. Dazu wurden 3 g der Kalluskultur entnommen. Außerdem wurden Kallus- und Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* zum Vergleich auch mit CB2- und B5-Medium angelegt. Die Zusammensetzung der einzelnen Medien ist in Kapitel 2.2 beschrieben.

2.4.3. Lignanextraktion

Die Lignanextraktion wurde durchgeführt, um einen Überblick über die enthaltene Menge an Podophyllotoxin und 6-Methoxypodophyllotoxin in den Zellkulturen zu erhalten. Hierzu wurden die Zellen am siebten Tag geerntet. Diese wurden mit einer Filternutsche unter Vakuum von dem Medium getrennt, bei -20°C eingefroren und anschließend im Gefriertrockner über mehrere Tage getrocknet. Die geernteten Zellen wurden dann im Mörser zerkleinert, und davon wurden dann 200 mg in ein Reaktionsgefäß gefüllt. Erst wurde das Pulver mit 2 ml Methanol gemischt, dann wurde die Suspension für 30 s im Ultraschallbad behandelt. Dies wurde nach einer Pause von 30 s wiederholt. Anschließend wurden 8 ml Wasser zugegeben. Dieses Wasser war mit Phosphorsäure auf pH 5 eingestellt worden. Zusätzlich wurde zu der Mischung 1 mg β -Glucosidase (aus Mandeln; ≥ 1000 U/mg) zugegeben, um den Zuckerrest von den vorhandenen Lignanen während einer Inkubation (3,5 h) bei 35°C im Wasserbad abzuspalten. Zur Extraktion der Lignane wurde Ethylacetat verwendet. Dazu wurden 10 ml zugegeben und 10 s lang intensiv gemischt. Zur Trennung der Phasen wurde 20 min bei 1000 g zentrifugiert. Die Ethylacetat-Phase wurde in Spitzkolben überführt und mittels Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt. Das Rücklösen wurde dreimal mit 500 μ l 50% Methanol durchgeführt. Die Menge an Lignanen wurde via HPLC ermittelt.

HPLC-Analytik

Für die Analyse der Extrakte wurde folgender Gradient aus Wasser und Acetonitril verwendet.

Als Säule wurde die Hypersil HyPurity Elite 250 x 4 mm; 5 μ C18 mit einer 20 mm Vorsäule des gleichen Materials benutzt und als Wellenlänge wurde 290 nm gewählt.

Zeit [min]	H ₂ O + 0,01% H ₃ PO ₄ [%]	ACN + 0,01% H ₃ PO ₄ [%]	Fluss [ml/min]
0	60	40	0,8
10	50	50	0,8
25	40	60	0,8
30	60	40	1
35	60	40	1

2.4.4. Elicitierung

Die Elicitierung wurde mit beiden angelegten Suspensionskulturen in MSLi-Medium durchgeführt (Ln1 bzw. Ln2). Dazu wurde die Anzahl der Kolben vermehrt und jeweils Methyljasmonat (100 mM in EtOH) und Ethanol steril filtriert. Am dritten Tag wurden Kolben mit 50 μ l Methyljasmonat und die Kolben zur Kontrolle mit 50 μ l Ethanol versetzt. Das Ernten der Zellen erfolgte nach 0, 12, 24, 48, 96 und 240 h. Für die Suspensionskultur Ln1 wurde eine zusätzliche Elicitierung durchgeführt, bei der nach 0, 4, 6, 8, 9 und 10 Tagen geerntet wurde. Anschließend wurden die Zellen gefriergetrocknet und eine Lignanextraktion (siehe 2.4.3) durchgeführt.

2.4.5. Kulturcharakterisierung

Zur Charakterisierung wurde die Suspensionskultur Ln1 verwendet. Hierzu wurde die Kultur vermehrt, sodass genügend Material für 14 Tage vorhanden war. Die Suspensionskulturen wurden, beginnend mit dem Mediumswechsel (Tag 0), täglich geerntet. Zum Ernten bzw. Abtrennen des Mediums wurden Filternutschen benutzt.

Zur Charakterisierung der Suspensionskultur wurden das Frischgewicht und das Gewicht nach der Trocknung im Gefriertrockner ermittelt. Von den frischen Zellen wurden außerdem Proben für einen Enzymrohextrakt und zur RNA-Isolation für eine Genexpressionsanalyse entnommen. Die restlichen getrockneten Zellen wurden nach der Messung des Trockengewichts zur Lignanextraktion benutzt. Mit dem Enzymrohextrakt wurden die Proteinmenge und die Aktivität der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) bestimmt.

Auch mit dem Medium wurden Messungen durchgeführt, um die Parameter pH-Wert, Leitfähigkeit und Zuckergehalt zu bestimmen.

2.4.5.1. Mediumsparameter

Wie schon erwähnt, wurde von dem Medium der Zuckergehalt, Leitfähigkeit und pH-Wert bestimmt. Die Messung des Zuckergehalts erfolgte mit einem Refraktrometer. Für die Leitfähigkeitsmessung mit dem Konduktometer wurde das Medium 1:4 mit Wasser verdünnt. Zur pH-Messung wurde das pH-Meter benutzt.

2.4.5.2. Enzymrohextrakt

Für den Rohextrakt wurden 5 g der frischen geernteten Zellen entnommen und mit 0,5 g Polyclar 10 und 5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 + 1 mM DTT versetzt. Die Zellen wurden dreimal 30 s mit dem Ultraturrax aufgeschlossen, wobei zwischen den Zyklen die Mischung 30 s auf Eis gekühlt wurde. Anschließend wurden die festen Zellbestandteile mittels einer Zentrifugation bei 10000 g und 4°C für 20 Minuten abgetrennt. Der Überstand wurde entnommen, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.4.5.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Eine Beschreibung des Vorgehens findet sich in Abschnitt 2.6.5. Die einzige Änderung war der Puffer, hier wurde als Referenz 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 benutzt.

2.4.5.4. Aktivität der Phenylalanin Ammoniak-Lyase

Der Enzymtest zum Feststellen der PAL-Aktivität wurde mit den Enzymrohextrakten durchgeführt.

Zusammensetzung:

- 175 µl Borsäure-Borax-Puffer pH 8,8
- 50 µl 0,1 M Phenylalanin (in Puffer gelöst)
- 25 µl Rohextrakt

Der Borsäure-Borax-Puffer besteht aus 78 mM Borsäure, 30 mM Borax und 20 mM NaCl. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 36°C im Wasserbad für 0 und 20 min. Die Reaktion wurde mit 50 µl 6 N HCl gestoppt. Das Ausschütteln wurde insgesamt dreimal mit 500 µl Ethylacetat ausgeführt. Anschließend wurde das Ethylacetat durch Abdampfen entfernt. Eine Auswertung der Ergebnisse wurde mit der HPLC durchgeführt.

HPLC-Analyse

Die benutzte Säule war eine Equisil ODS C18 5 µ 250 x 4 mm mit einer 20 mm Vorsäule. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 290 nm und als Laufmittel wurde 50% Methanol

mit 0,01% Phosphorsäure verwendet. Die Proben wurden in 100 µl 50% Methanol, angesäuert mit 0,01% Phosphorsäure, gelöst.

2.4.5.5. Untersuchung der Genexpression

Für die Analyse der Expression verschiedener Gene wurde aus den gesammelten Zellen der unterschiedlichen Tage RNA isoliert und daraus cDNA gewonnen. Mit der hergestellten cDNA wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Eine Erklärung der Verfahrensweise wird im Abschnitt 2.5.14 gegeben.

2.4.6. Mikrosomenpräparation

Eine Mikrosomenpräparation wurde durchgeführt, um die Aktivität eines Cytochrom-P450-Enzyms mit Matairesinol nachzuweisen.

Dafür wurden die Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* und *Linum album* am fünften und sechsten Tag, die Suspensionskulturen von *Linum flavum* am siebten und am achten Tag geerntet. Zu Beginn wurde der Mörser auf Eis platziert und vorgekühlt. Die Zellen wurden abgewogen und mit einem Zehntel der Zellmasse an Polyclar 10 gemischt. Von dem 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5 mit 1 mM DTT wurde die Menge entsprechend der Einwaage an Zellen vorbereitet. Ein Teil des Puffers wurde zum Mörsern zu den Zellen gegeben. Das Homogenat wurde in einen Zentrifugenbecher gefüllt. Mit dem restlichen Puffer wurden Mörser und Pistill gespült und zu der Suspension in den Zentrifugenbecher gegeben. Anschließend wurde bei 8000 g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgemessen und dann in einen Kolben gefüllt. Unter stetigem Rühren wurde tropfenweise 1 M MgCl₂ zugegeben, die Menge entsprach $\frac{1}{20}$ des Volumens des Überstands. Die Suspension wurde 20 min weitergerührt und bei 20000 g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Dieser Überstand wurde verworfen und das Pellet im Puffer (s.o.) resuspendiert. Die Suspension wurde in einem Glashomogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert, und mittels Bradford-Test (s. 2.6.5) wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Für die Enzymtests wurde eine Konzentration von 0,625 mg/ml eingestellt. Zusätzlich zu dem Enzymtest mit Matairesinol wurde als Positivkontrolle ein weiterer Enzymtest mit Zimtsäure durchgeführt.

Test mit Zimtsäure (Gesamtvolumen 500 µl)

400 µl Mikrosomenpräparation
12,5 µl 50 mM Zimtsäure (gelöst in 50% EtOH)
5 µl 50 mM NADPH
5 µl 1 M DTT
5 µl 0,1 M DIECA
72,5 µl 0,1 M Tris/HCl pH 7,5

Test mit Matairesinol (Gesamtvolumen 500 µl)

400 µl Mikrosomenpräparation
12,5 µl 5 mM Matairesinol (gelöst in 50% MeOH)
5 µl 50 mM NADPH
5 µl 1 M DTT
5 µl 0,1 M DIECA
72,5 µl 0,1 M Tris/HCl pH 7,5

Die Proben wurden bei beiden Tests bei 25°C unter Schütteln inkubiert (900 UpM). Als Inkubationszeiten wurden 0, 10, 20, 30, 60 oder 120 min gewählt. Die Reaktion wurde mit 50 µl 6 N HCl gestoppt und dreimal mit 500 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wurde unter dem Abzug über Nacht abgedampft.

Es wurde außerdem noch ein Test mit längeren Inkubationszeiten (0, 1, 4, 6 und 20 h) und einem NADPH-regenerierenden System ausgeführt.

400 µl Mikrosomenpräparation
12,5 µl 5 mM Matairesinol
5 µl 1 M DTT
5 µl 0,1 M DIECA
5 µl 500 mM Glucose-6-phosphat
10 µl 50 mM NADP
0,9 µl Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
61,6 µl 0,1 M Tris/HCl pH 7,5

Die Auswertung der Tests erfolgte mittels HPLC. Die Proben wurden dafür in 50% Methanol rückgelöst.

Für die Messung der Enzymtests mit Zimtsäure wurde 50% MeOH mit 0,01% H_3PO_4 als Laufmittel verwendet und eine Wellenlänge von 309 nm eingestellt. Als Säule wurde die Equisil ODS C18 5 μ 250 x 4 mm mit einer 20 mm Vorsäule verwendet.

Die Proben des Matairesinol-Enzymtests wurden bei 280 nm vermessen und als Säule wurde die Hypersil BDS C18 5 μ 150 x 4 mm mit einer Vorsäule von 20 mm verwendet. Als Laufmittel wurde ein Gradient aus Wasser mit 0,1% Ameisensäure und Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure benutzt (s. unten) bei einem Fluss von 1 ml/min. Die Proben wurden in 50% Methanol gelöst.

Zeit [min]	H ₂ O + 0,1% Ameisensäure [%]	ACN + 0,1% Ameisensäure [%]
0	95	5
11	75	25
16	60	40
20	0	100
21,5	0	100
22	95	5
28	95	5

2.5. MOLEKULARBIOLOGIE

2.5.1. Isolierung von genomischer DNA

Als Material für die Isolierung von genomischer DNA (Rogers und Bendich, 1985) dienten die geernteten Zellen der Suspensionskulturen. Die benutzten Materialien, wie Mörser, Pistill, Spatel oder Reaktionsgefäße, wurden mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Außerdem wurde mit einmal autoklavierten Pipettenspitzen und Reaktionsgefäßen gearbeitet. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert, dabei wurde darauf geachtet, dass diese nicht auftauen. Von dem Pulver wurden 200 mg in ein Reaktionsgefäß gefüllt und mit 300 μ l 2x CTAB-Puffer (2% CTAB, 100 mM Tris/HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1,4 M NaCl, 1% Polyvinylpyrrolidon [MW 40000]) versetzt. Zum leichteren Pipettieren wurde der Puffer vorher auf 65°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben bei 65°C für 20 min inkubiert, und zwischendurch wurde ein- bis zweimal gemischt. Die Proben wurden 20 min auf Eis abgekühlt, und danach wurden 300 μ l Chloroform zugegeben und gemischt. Zentrifugiert wurde die Suspension für 5 min bei 13000 g und der Überstand danach zu 30 μ l 10x CTAB-Puffer (10% CTAB, 0,7 M NaCl) in neue Reaktionsgefäße gefüllt. Auch der 10x CTAB-Puffer wurde vorher auf 65°C erhitzt. Das

Ganze wurde mit 300 µl Chloroform gemischt und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Von dem Überstand wurde 250 µl entnommen und zu 250 µl CTAB-Präzipitationspuffer (1% CTAB, 50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) gegeben. Dann wurde für 10 min bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl High Salt TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 1 M NaCl) resuspendiert und nach der Zugabe von 99%igem Ethanol bei -20°C inkubiert. Erneut erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 g für 15 min. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl 0,1 M TE-Puffer mit 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Die Lösung wurde zum Schluss für 20 min bei 37°C inkubiert. Die isolierte DNA wurde dann direkt für die PCR benutzt.

2.5.2. Isolierung von RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll der „Single-Step Methode“ von (Chomczynski und Sacchi, 1987). Vor der Extraktion der RNA wurden die benutzten Spitzen und Reaktionsgefäße zweimal autoklaviert und alle Arbeiten mit Handschuhen durchgeführt. Außerdem wurden Mörser, Pistill und Spatel bei 200°C für 2 h gebacken. Diese Maßnahmen wurden durchgeführt, um einen Abbau der RNA durch RNasen zu vermeiden. Die am dritten, fünften oder siebten Tag geernteten Zellen wurden in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser zerkleinert. Dabei dürfen die Zellen, wie bei der Isolierung von genomischer DNA, nicht auftauen. In die Reaktionsgefäße wurden 50 mg Pulver gefüllt und dann 500 µl Lösung D (4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat Dihydrat pH 7, 0,5% N-Laurylsarcosin) zugegeben. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 3 min inkubiert, wobei zwischendurch mehrmals gut gemischt wurde. Danach wurde unter Kühlen weitergearbeitet. Die Mischung wurde mit 50 µl 2 M Natriumacetat-Lösung pH 4 versetzt und nochmal sanft gemischt. Nachdem 500 µl Phenol (mit Citrat-Puffer gesättigt) zugegeben wurde, folgte die Zugabe von 100 µl Chloroform. Dann wurden die Proben 10 s gut geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis wurden die Proben 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 400 µl entnommen und mit 400 µl gekühltem Isopropanol gemischt. Zur Fällung der RNA wurden die Proben 15 min bei -20°C gelagert. Erneut wurde bei 12000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erst mit 70%igem EtOH und dann mit unverdünntem EtOH gewaschen. Zwischendurch wurde 5 min bei 7500 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde bei 37°C getrocknet und dann in 20 µl zweimal autoklaviertem Wasser gelöst. Zur Bestimmung der Menge und Qualität der extrahierten RNA wurde neben einer Gelelektrophorese (siehe 2.5.5) noch eine photometrische Messung durchgeführt.

2.5.3. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem RevertAid-Kit von Fermentas/Thermo Scientific durchgeführt. Dabei wurde mit Handschuhen und zweimal autoklavierten Materialien (Spitzen und Reaktionsgefäße) gearbeitet. Zur Synthese der cDNA wurden 3 µg RNA eingesetzt. Diese wurden mit 1 µl Oligo(dT)₁₈-Primer versetzt und dann mit Wasser auf 12,5 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde kurz gemischt, zentrifugiert und bei 65°C für 5 min inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt und nochmal kurz zentrifugiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien zugegeben:

4 µl	5x Reaktionspuffer
0,5 µl	Ribolock RNase Inhibitor
2 µl	dNTP-Mix
1 µl	RevertAid H Minus Reverse Transcriptase

Nach der Zugabe wurde gemischt, zentrifugiert und für 1 h bei 42°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden wurde für 10 min auf 70°C erhitzt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert und dann für die PCR benutzt.

2.5.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.5.4.1. Standard-PCR

Diese PCR wurde durchgeführt, um Teilsequenzen von Genen zu finden, die an der Lignanbiosynthese beteiligt sind. Dazu wurden folgende Reagenzien zusammenpipettiert:

5 µl	5x GoTaq-Reaktionspuffer
3 µl	MgCl ₂ [25 mM]
0,5 µl	dNTP-Mix [10 mM]
2 µl	cDNA/gDNA
1 µl	Primer-f [10 µM]
1 µl	Primer-r [10 µM]
0,1 µl	GoTaq Polymerase [5 U/µl]
12,4 µl	H ₂ O

Dieses Schema wurde durch Ändern der Konzentration an MgCl₂, Primer und cDNA variiert.

PCR-Programm:

1. Zyklus	94°C	2 min
	$T_m - 5^\circ\text{C}$	30 s
	70°C	1 min
2. - 39. Zyklus	94°C	1 min
	$T_m - 5^\circ\text{C}$	30 s
	70°C	1 min
40. Zyklus	94°C	1 min
	$T_m - 5^\circ\text{C}$	30 s
	70°C	10 min

Abkühlen auf 6°C

Je nach Primer wurden verschiedene Annealing-Temperaturen bzw. Temperaturgradienten ausprobiert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation der entsprechenden Gensequenz wurde eine Gelelektrophorese (s. 2.5.5) durchgeführt.

2.5.4.2. Degenerierte Primer für Standard-PCR

Alle benutzten Primer wurden von Eurofins MWG Operon geliefert.

Für die Suche nach Methyltransferasen wurden degenerierte Primer aus bekannten konservierten Bereichen dieser Enzymklasse ausgesucht. Dabei wurden verschiedene Kombinationen der Primer ausprobiert:

Primer-Name	Sequenz [5' → 3']	Schmelztemperatur T_m
JR-MT1f	TNGTNGAYGTNGGNGGNG	58,2°C
JR-MT2f	ARCAYGTNGGNGGNGAYATG	59,4°C
JR-MT2r	CATRTCNCNCNACRTGYT	59,4°C
JR-MT3r	GTNCKYTCYTTNCCNCC	55,2°C

Um das CYP-Enzym zu finden, welches an der Umsetzung von Matairesinol zu Pluviatolid beteiligt ist, wurden folgende degenerierte Primer verwendet:

Primer-Name	Sequenz [5' → 3']	Schmelztemperatur T_m
CYP719-1f	AARCCNYTNGAYCAYHTNAARA	55,3°C
CYP719-2f	CNYTNGCNATHCCNCAYAA	55,2°C
CYP719-2r	TGNGGDATNGCNARNGG	54,8°C
CYP719-3r	CYTCNARNGGNGTYTTCAT	54,5°C

Außerdem wurden noch CODEHOP-Primer für die Amplifikation dieses Cytochrom-P450-Enzyms ausprobiert.

CODEHOP steht für Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer. Die Methode der CODEHOP-PCR kann benutzt werden, um Gensequenzen zu finden, die entfernt verwandt sind. Bei der Auswahl der Primer werden aus einem Alignment mehrerer Gensequenzen verschiedene Blöcke konservierter Bereiche gebildet. Aus diesen hochkonservierten Bereichen wird die „5' consensus clamp region“ des Primers gewählt. Das 3' Ende des Primers besteht aus der „3' degenerate core region“, die aus allen möglichen Sequenzkombinationen zusammengesetzt ist. Durch diesen Aufbau soll die Bindung der Primer und damit auch die Effizienz der PCR verbessert werden (Rose et al., 1998).

Primer-Name	Sequenz [5' → 3']	Schmelztemperatur T_m
CYPneu-1f	GCTAAAGTTCATGGAGCTGTTATGACNRTNTGGA	67,7°C
CYPneu-1r	TACTTYGGNTAACGAGGAAAACGATAAGGAGT	65,6°C
CYPneu-2r	CCNTACKCNTAAACACGACCTTACCTACAAC	67,5°C

2.5.4.3. 3' RACE PCR

RACE steht für Rapid Amplification of cDNA Ends und wird durchgeführt, um das 3' und das 5' Ende eines bekannten Genfragments zu finden. Bei der 3' RACE macht man sich den Poly(A)-Schwanz der mRNA zu Nutze. Der Q_T -Primer besteht zum einen aus dem Teil, der an diesen Anhang binden kann, zum anderen aus der Sequenz des äußeren Primers Q_O und dem inneren Primer Q_i . Diese Primer können dann bei der PCR an die cDNA binden und dann, zusammen mit den genspezifischen Primern (GSP) das 3' Ende der Sequenz amplifizieren (Scotto-Lavino et al., 2006a).

Zunächst wurde mit Hilfe des RevertAid Kits cDNA synthetisiert. Wie im Abschnitt 2.5.3. bereits beschrieben, wurde mit zweimal autoklaviertem Material und Handschuhen gearbeitet, bis die cDNA hergestellt war. Danach wurde mit einfach autoklaviertem Material weitergearbeitet. Dabei wurden 5 µg RNA mit H₂O auf ein Volumen von 11,5 µl aufgefüllt und nach Mischen 5 min bei 70°C inkubiert.

Nach dem Abkühlen auf Eis wurden

4 µl	5x Reaktionspuffer
0,5 µl	Q _T -Primer [100 ng/µl]
1 µl	RNase Inhibitor
2 µl	dNTP-Mix [10 mM]

zugegeben. Diese Mischung wurde 5 min bei 25°C inkubiert, und danach wurde 1 µl der Reversen Transkriptase zugefügt. Die Probe wurde 60 min bei 42°C inkubiert und zur Inaktivierung der Transkriptase für 15 min auf 70°C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und zum Abbau von RNA noch mit 0,3 µl RNase H (5 U) versetzt. Erneut erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 20 min. Die hergestellte cDNA wurde mit TE-Puffer 1:5 verdünnt und diese Verdünnung erneut 1:10 mit dem gleichen Puffer verdünnt. Als nächster Schritt wurde eine PCR durchgeführt.

1. PCR

5 µl	10x TrueStart Taq Puffer
1 µl	dNTP-Mix [10 mM]
3 µl	MgCl ₂ [25 mM]
1 µl	3'-cDNA-Verdünnung
2,5 µl	Q _O -Primer [10 µM]
2,5 µl	GSP1-Primer [10 µM]
0,5 µl	TrueStart Taq Polymerase [5 U/µl]
34,5 µl	H ₂ O

1. PCR-Programm:

1. Zyklus	95°C	5 min
	53°C	2 min
	72°C	40 min
2. - 30. Zyklus	94°C	30 s
	53°C	30 s
	72°C	3 min
31. Zyklus	94°C	30 s
	53°C	30 s
	72°C	15 min

Abkühlen auf 6°C.

Von diesem PCR-Produkt wurden 5 µl 1:20 mit TE-Puffer verdünnt und für die nächste PCR verwendet.

2. PCR

5 µl	10x TrueStart Taq Puffer
1 µl	dNTP-Mix [10 mM]
3 µl	MgCl ₂ [25 mM]
1 µl	PCR-Produkt-Verdünnung
2,5 µl	Q _i -Primer [10 µM]
2,5 µl	GSP2-Primer [10 µM]
0,5 µl	TrueStart Taq Polymerase [5 U/µl]
34,5 µl	H ₂ O

2. PCR-Programm

Aktivierung	95°C	5 min
1. - 29. Zyklus	94°C	30 s
	53°C	30 s
	72°C	3 min
30. Zyklus	94°C	30 s
	53°C	30 s
	72°C	15 min
Abkühlen auf 6°C		

Das Ergebnis wurde mittels Gelelektrophorese (s. 2.5.5) ausgewertet.

Primer für die 3' RACE PCR

Primer-Name	Sequenz [5' → 3']	Schmelztemperatur T _m
Q _T -Primer	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACT CGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	-
Q _O -Primer	CCAGTGAGCAGAGTGACG	58,2°C
Q _i -Primer	GAGGACTCGAGCTCAAGC	58,2°C
LnGSP1	CAGCTTCCCTGTTTCCTCC	58,8°C
Ln-GSP2	CAACATGATAGCGTCGGCG	58,8°C
La-GSP1	CGCCACTGGCAGAATGCA	58,2°C
La-GSP2	CAGTGCTCGTCGCTCCAA	58,2°C

2.5.4.4. 5' RACE PCR

Bei der 5' RACE PCR wird cDNA mit dem genspezifischen Primer GPRT hergestellt und anschließend ein Poly(A)-Anhang an das 5' Ende angebracht. Dadurch kann wieder der Q_T-Primer, bzw. die Q_O- und Q_I-Primer, zur Amplifikation eingesetzt werden (Scotto–Lavino et al., 2006b).

Zunächst wurde die cDNA wie für die 3' RACE hergestellt. Als einzige Änderung wurden 0,5 µl GPRT-Primer [100 ng/µl] statt des Q_T-Primer zugegeben (siehe 2.5.4.3).

Nachdem die cDNA fertig hergestellt war, wurde sie mit 0,75 µl RNase H (1,5 U) versetzt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 20 min. Die cDNA wurde dann 1:10 mit TE-Puffer verdünnt und mittels NucleoSpin®-Extract II Kit von Macherey und Nagel aufgereinigt. Dazu wurden 400 µl NT-Puffer zugegeben und die komplette Lösung auf die Nucleospin®-Säulen gegeben. Nach der Zentrifugation bei 11000 g für 1 min wurde der Durchfluss verworfen. Die gebundene cDNA wurde mit 700 µl NT3-Puffer gewaschen und erneut bei 11000 g für 1 min zentrifugiert. Um den restlichen Puffer von den Säulen zu entfernen wurde für 2 min bei 11000 g zentrifugiert. Zur Elution der cDNA wurden 15 µl H₂O zugegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Nun war die cDNA bereit zum Anhängen des Poly(A)-Schwanzes:

15 µl	cDNA
4 µl	5x Tdt-Puffer
0,5 µl	dATP [2,5 mM]
0,5 µl	terminale Desoxynucleotidyltransferase (Tdt) [20 U/µl]

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 5 min, und zur Inaktivierung der Transferase wurde auf 70°C für 10 min erhitzt. Vor der Durchführung der ersten PCR wurde die synthetisierte cDNA nochmal 1:2,5 mit TE-Puffer verdünnt.

1. PCR

5 µl	10x TrueStart Taq Puffer
1 µl	dNTP-Mix [10 mM]
3 µl	MgCl ₂ [25 mM]
1 µl	5'-cDNA-Verdünnung
2,5 µl	Q _T -Primer [10 µM]
2,5 µl	Q _O -Primer [10 µM]
2,5 µl	5'-GSP1-Primer [10 µM]
0,5 µl	TrueStart Taq Polymerase [5 U/µl]
34,5 µl	H ₂ O

1. PCR-Programm

1. Zyklus	95°C	5 min
	48°C	2 min
	72°C	40 min
2. - 30. Zyklus	94°C	30 s
	53°C	30 s
	72°C	3 min
31. Zyklus	94°C	30 s
	53°C	30 s
	72°C	15 min

Abkühlen auf 6°C

Je 5 µl des PCR-Reaktionsansatzes wurde 1:20 mit TE-Puffer verdünnt und für eine zweite PCR benutzt.

2. PCR

5 µl	10x TrueStart Taq Puffer
1 µl	dNTP-Mix [10 mM]
3 µl	MgCl ₂ [25 mM]
1 µl	cDNA-Verdünnung
2,5 µl	Qi-Primer [10 µM]
2,5 µl	5'-GSP2-Primer [10 µM]
0,5 µl	TrueStart Taq Polymerase [5 U/µl]
34,5 µl	H ₂ O

2. PCR-Programm

Aktivierung	95°C	5 min
1. – 29. Zyklus	94°C	30 s
	53°C	30 s
	72°C	3 min
30. Zyklus	94°C	30 s
	53°C	30 s
	72°C	15 min

Abkühlen auf 6°C

Das Ergebnis wurde mittels Gelelektrophorese (siehe 2.5.5) ausgewertet.

Primer für die 5'-RACE-PCR

Primer-Name	Sequenz [5' → 3']	Schmelztemperatur T_m
Q _T -Primer	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACT CGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	-
Q _O -Primer	CCAGTGAGCAGAGTGACG	58,2°C
Q _i -Primer	GAGGACTCGAGCTCAAGC	58,2°C
GPRT-Ln190	TGTTTCGAGTCCGTTCCCG	58,2°C
GPRT-La257	ATGTTTCGCCAGCGTCCCCTC	63,5°C
GSP1-Ln190	CCGCCGACGCTATCATGT	58,2°C
GSP2-Ln190	GCACAACTGGAGCGACGA	58,2°C
GSP1-Ln257	CGGCGACGCCATTTTCATG	58,8°C
GSP2-Ln257	GTCACGATTGGAGCGACG	58,2°C

2.5.4.5. PCR mit Phusion-Polymerase

Diese PCR wurde durchgeführt, um die Vollängen-Sequenzen der gefundenen Methyltransferasen zu amplifizieren. Diese Polymerase besitzt eine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität und damit eine „proof-reading“-Funktion.

4 µl 5x Phusion HF Puffer
 0,4 µl dNTP-Mix [10 mM]
 1 µl Primer-f [10 µM]
 1 µl Primer-r [10 µM]
 2 µl cDNA
 0,2 µl Phusion DNA Polymerase [2 U/µl]
 11,4 µl H₂O

PCR-Programm

1. Zyklus	98°C	30 s
2. - 36. Zyklus	98°C	10 s
	$T_m - 5^\circ\text{C}$	30 s
	72°C	30 s
37. Zyklus	72°C	10 min
Abkühlen auf 6°C		

Das Ergebnis wurde mittels Gelelektrophorese (s. 2.5.5) ausgewertet.

Volllängen-Primer

Diese Primer wurden jeweils mit Restriktionsschnittstellen versehen, um die Sequenzen anschließend in den gewünschten Expressionsvektor einzufügen.

Primer-Name	Sequenz mit Schnittstelle [5' → 3']	Restriktions-enzym	Schmelz-temp. T_m ohne Anhang
MT1-VL-f1	TTACAT ATGGGGATAAATCAACAGAG	NdeI	53,2°C
MT1-VL-f2	TTACAT ATGGAAGATACAGAATCTCG	NdeI	53,2°C
MT1-VL-r	TAAC TCGAGTTATTTTGACCTAACAGACGG	XhoI	51,1°C
VLMt-La-f	ATTCTGCA GATGGGGTCAACCCAGAAAC	PstI	59,3°C
VLMt-La-r	TATG AATTCTCAGGCGGCAGTTTTCAGGA	EcoRI	59,3°C

2.5.5. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde mit 0,7%igem Agarose-Gel durchgeführt, bei kleineren Fragmenten wurde ein 1,2%iges Gel verwendet. Das Agarose-Gel (ca. 40 ml pro Gelträger) wurde mit TBE- (44,5 mM Tris, 44,5 mM Borsäure und 1 mM Na₂-EDTA) bzw. TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure und 1 mM Na₂-EDTA) hergestellt und mit 0,7 µl - 1 µl 1%iger Ethidiumbromid-Lösung gemischt. Die Puffer wurden auch als Laufpuffer für die Elektrophorese benutzt. Um die Proben in die Taschen des Gels zu füllen, wurden sie mit 6x Loading Dye (0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol, 60% Glycerol und 60 mM EDTA) versetzt. Als Marker wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix bzw. O'GeneRuler 1 kb Ladder ready-to-use von Thermo Scientific benutzt. Die Elektrophorese wurde bei 110 V für 45 min - 60 min ausgeführt und das Gel danach mit Hilfe des Geldokumentationssystems (UV- bzw. blau-grünem LED-Licht) ausgewertet.

2.5.6. Gelextraktion

Nachdem die gewünschten Banden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten worden waren, sollte die DNA daraus extrahiert werden. Dazu wurde das NucleoSpin®-Extract II Kit von Macherey and Nagel benutzt. Das Gelstück wurde in NT-Puffer (200 µl Puffer pro 100 mg Gel) gelöst, indem es im Puffer bei 50°C für etwa 10 min inkubiert wurde. Das aufgelöste Gel wurde auf die Säulen aufgetragen und bei 11000 g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen mit je 700 µl NT3-Puffer gewaschen. Nach der Zentrifugation bei 11000 g für 1 min wurde zum Trocknen der Säulenmembran eine erneute Zentrifugation bei

11000 g für 2 min durchgeführt. Zum Eluieren der DNA erfolgte nach Zugabe von 25 µl H₂O eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min. Zentrifugiert wurde schließlich bei 11000 g für 1 min, und die Menge an DNA wurde mit dem Photometer bestimmt.

2.5.7. Ligation

2.5.7.1. Ligation in einen Klonierungsvektor

Für die Ligation von PCR-Produkten in einen geeigneten Klonierungsvektor wurde das PCR Cloning Kit von Qiagen verwendet. Der Ligationsansatz wurde wie folgt zusammenpipettiert:

0,5 µl pDrive Cloning Vector
2 µl PCR-Produkt nach Gelextraktion
2,5 µl 2x Ligation Master Mix

Der Ansatz wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Je nach DNA-Menge nach der Aufreinigung, wurde diese Konzentration zusätzlich durch Entfernen des H₂O und Rücklösen in 2 µl H₂O erhöht.

2.5.7.2. Ligation in Expressionsvektoren

Zur Vorbereitung der Ligation wurde der Vektor und die einzusetzende DNA mit einem Restriktionsverdau geschnitten und über Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Gelextraktion konnte die Ligation durchgeführt werden. Zur Berechnung der Menge an Insert wurde folgende Formel verwendet, dabei wurden 3 µl linearisierter Vektor eingesetzt.

$$\frac{m(\text{Vektor}) * g(\text{Insert})}{g(\text{Vektor})} * r = m(\text{Insert})$$

m(Vektor): Menge an Vektor in ng
m(Insert): Menge an Insert in ng
g(Vektor): Größe des Vektors in kb
g(Insert): Größe des Inserts in kb
r: Verhältnis Insert zu Vektor

Zusammensetzung:

3 µl Vektor
x µl Insert
1 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer
1 µl T4 DNA Ligase [5 U/µl]
1 µl PEG 4000
y µl H₂O

Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes war 10 µl.

Die Ligationsansatz wurde über Nacht oder mehrere Tage bei 4°C inkubiert.

Als Vektor wurde im Fall der Methyltransferasen LnMT3 und LnMT3s der pET15b-Expressionsvektor eingesetzt und für die Kaffeesäure O-Methyltransferase der pRSET C-Expressionsvektor.

2.5.8. Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde zunächst eine Übernachtskultur mit 2 ml LB-Medium und 2 µl Tetracyclin (12,5 mg/ml Tetracyclin in EtOH) angelegt. Zellen wurden von einer älteren Charge entnommen und mittels eines Zahnstochers in das vorbereitete Medium überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 220 UpM inkubiert. Für das weitere Vorgehen wurde 90 ml LB-Medium mit 90 µl Tetracyclin (12,5 mg/ml) versetzt und eine Probe für die Bestimmung der OD₆₀₀ entnommen. Die Suspension wurde komplett zum Medium gegeben und anschließend bei 37°C und 220 UpM inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. Die weiteren Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Zum Trennen der Bakterien vom Medium wurden sterile Zentrifugationsgefäße benutzt und eine Zentrifugation für 10 min bei 3000 g und 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen, und die Bakterienpellets wurden in 10 ml kalter steriler CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert und in einem Gefäß vereinigt. Nach einer Zentrifugation für 12 min bei 2500 g und 4°C wurde das Pellet erneut in 10 ml kalter CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert. Die Suspension wurde 20 min auf Eis inkubiert und wie oben beschrieben nochmal zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml 100 mM CaCl₂ mit 15% Glycerin resuspendiert und die Suspension in Portionen (150 µl) aliquotiert. Nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die kompetenten Zellen bei -80°C aufbewahrt. Die Behandlung mit CaCl₂ dient zur Erhöhung der Permeabilität der Membran der Zellen und damit zur besseren Aufnahme der Plasmide bei der Transformation.

2.5.9. Transformation

Vor der Transformation wurde die Ligase durch eine Inkubation bei 65°C für 15 min inaktiviert. Zur gleichen Zeit wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Als kompetente Zellen wurden *E. coli* EZ (s. 2.5.8) verwendet. Bei der Transformation für die spätere Proteinexpression wurden die kompetenten Zellen *E. coli* BL21(DE3)pLysS oder *E. coli* SoluBL21 benutzt. Der erhitzte Ligationsansatz wurde nach Abkühlen komplett zu den kompetenten Zellen gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s, um die Aufnahme des Plasmids in die Zellen zu erleichtern. Danach wurde 2 min auf Eis abgekühlt und 200 µl SOC-Medium (s. 2.3) zugegeben. Als nächstes folgte eine Inkubation bei 37°C, 750 UpM für 30 min. Um die Transformation

abzuschließen, wurde die Bakteriensuspension auf die vorbereiteten Platten mit LB-Medium (s. 2.3) und Ampicillin (100 µg in 1 ml LB-Medium) verteilt. Bei der Transformation mit dem pDrive-Vektor wurde das LB-Medium mit 100 µl 0,1 M IPTG und 20 µl X-Gal (50 mg/ml in Dimethylformamid) zur Blau-Weiss-Selektion versetzt. Dabei werden positive Klone anhand ihrer weißen Farbe identifiziert, während die Kolonien, die ein leeres Plasmid enthalten, aufgrund einer intakten β -Galactosidase eine blaue Färbung aufweisen.

Bei allen gentechnischen Aufgaben, bei denen Ampicillin und IPTG verwendet wurde, wurden sterilfiltrierte Lösungen benutzt.

2.5.10. Übernachtkulturen

Nach der Transformation wurden von den gewachsenen Bakterienkolonien Übernachtkulturen angelegt. Dazu wurde 4 ml LB-Medium mit 20 µl Ampicillin (20 mg/ml) in ein Reagenzglas gefüllt. Um Bakterien von der LB-Platte in das flüssige Medium zu überführen, wurden sterile Zahnstocher benutzt. Die fertigen Kulturen wurden in den Inkubationsschüttler gestellt und bei 37°C und 220 UpM für ungefähr 16 h inkubiert.

Aus diesen Übernachtkulturen wurden, nach einer positiven Sequenzierung (Seqlap, Eurofins MWG Operon), Glycerin-Stammkulturen angelegt. Zum Anlegen dieser Kulturen wurden 425 µl Bakteriensuspension mit 75 µl Glycerin gemischt. Anschließend wurden diese in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.5.11. Plasmidpräparation

Um das Plasmid aus den Bakterien zu isolieren, wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Dazu wurden 1,5 ml Bakteriensuspension der Übernachtkulturen entnommen und 5 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang nochmal wiederholt. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA) mit 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Nach der Zugabe von 250 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde die Suspension gemischt und die Lösung wurde klar. Das Hinzufügen von 350 µl Puffer N3 (4,2 M Guanidin-HCl, 0,9 M Kaliumacetat, pH 4,8) führte zu der Bildung eines Niederschlags, und dieser wurde bei 16000 g für 10 min abzentrifugiert. Dieser Überstand wurde auf die Säulen des Qiaprep® Spin Miniprep Kit von Qiagen gefüllt und bei 16000 g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das gebundene Plasmid zuerst mit 500 µl Puffer PB (5 M Guanidin-HCl, 30% Isopropanol) und danach mit 750 µl Puffer PE (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 80% Ethanol) gewaschen. Dazwischen erfolgte jeweils eine Zentrifugation bei 16000 g für 1 min. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der restliche

Puffer mit einer Zentrifugation bei 16000 g für 2 min entfernt. Die Säulen wurden in vorbereitete Reaktionsgefäße gestellt und anschließend 50 µl H₂O zur Elution zugegeben. Vor der Zentrifugation bei 11000 g für 1 min, wurde die Säule bei Raumtemperatur für 3 min inkubiert. Anschließend wurde zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation ein Restriktionsverdau (s. 2.5.12) durchgeführt. Die positiven Proben wurden zum Sequenzieren geschickt (Seqlab, Eurofins MWG Operon).

2.5.12. Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden je nach Plasmid verschiedene Enzyme eingesetzt. Nach der Zugabe der einzelnen Komponenten wurden die Ansätze bis zu 3 h bzw. über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auswertung mittels Gelelektrophorese (2.5.5).

2.5.12.1. pDrive

Der Verdau des pDrive-Vektors wurde durchgeführt mit:

16 µl	H ₂ O
2 µl	EcoRI-Puffer
1 µl	EcoRI [10 U/µl]

Die Mischung wurde mit 1 µl Plasmid versetzt und wie oben beschrieben inkubiert.

2.5.12.2. pET15b

Für diesen Verdau wurden folgende Komponenten zusammengefügt:

7 µl	H ₂ O
0,5 µl	NdeI
0,5 µl	XhoI
2 µl	CutSmart Puffer

Zu der Lösung wurden 3 µl Plasmid gegeben und inkubiert.

Dieser Verdau wurde ebenfalls durchgeführt, um den Vektor und die einzufügenden Gensequenzen für die Ligation vorzubereiten:

14 µl	Vektor od. Insert
2 µl	NdeI
2 µl	XhoI
2 µl	CutSmart Puffer

2.5.12.3. pRSET C

Die Zusammensetzung dieses Verdaus war:

7 µl	H ₂ O
0,5 µl	PstI
0,5 µl	EcoRI
2 µl	Orange Buffer

Anschließend wurden 3 µl Plasmid zugefügt. Der Verdau des Expressionsvektors und des Genstücks für die Ligation wurden mit PstI und EcoRI ausgeführt (siehe 2.5.11.2).

2.5.13. SMARTer® RACE 5'/3' Kit

Dieses Kit wurde verwendet, um die 3' und 5' Enden der gefundenen Teilsequenzen zu finden.

2.5.13.1. cDNA-Synthese

Mit Hilfe des SMARTer® RACE 5'/3' Kit von Clontech wurde zuerst cDNA hergestellt. Auch hier wurde, wie in Abschnitt 2.5.3 erklärt, mit zweimal autoklavierten Materialien gearbeitet. Dazu wurde ein Puffer Mix pipettiert, der bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert wurde.

4 µl	5x First-Strand Buffer
0,5 µl	DTT [100 mM]
1 µl	dNTPs [20 mM]

Als Nächstes wurden für die 5'-cDNA Synthese folgende Reagenzien kombiniert:

1 µl	RNA [10 ng - 1 µg]
1 µl	5'-CDS Primer A [12 µM]
9 µl	H ₂ O

Die Lösung für die Synthese der 3'-cDNA setzte sich folgendermaßen zusammen:

1 µl	RNA [10 ng - 1 µg]
1 µl	3'-CDS Primer A
10 µl	H ₂ O

Beide Lösungen wurden gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend für 3 min bei 72°C inkubiert. Danach erfolgte eine Abkühlung auf 42°C für 2 min und eine erneute Zentrifugation. Zu der Mischung für die 5'-cDNA wurde 1 µl SMARTer II A Oligonucleotide [24 µM] zugegeben. Weiterhin wurde ein Master Mix hergestellt, von dem 8 µl jeweils zu den 5'- bzw. 3'-cDNA gegeben wurde:

5,5 µl	Buffer Mix
0,5 µl	RNase Inhibitor [40 U/µl]
2 µl	SMARTScribe Reverse Transkriptase [100 U]

Nach dem Mischen und Zentrifugieren wurden die Lösungen erst bei 42°C für 90 min und dann bei 70°C für 10 min inkubiert. Um die cDNA für die Amplifikation vorzubereiten, wurden 90 µl Tricin-EDTA-Puffer zugegeben.

2.5.13.2. PCR

Zur Durchführung der PCR wurde ein Master Mix für die 3'- und die 5'-cDNA hergestellt.

15,5 µl	H ₂ O
25 µl	2x SeqAmp Buffer
1 µl	SeqAmp DNA Polymerase

In ein Reaktionsgefäß wurden

2,5 µl	5'- bzw. 3'-cDNA
5 µl	10x Universal Primer A Mix (UPM)
1 µl	Gene-Specific Primer (GSP)
41,5 µl	Master Mix

gefüllt.

Die Amplifizierung wurde mit zwei verschiedenen Programmen ausprobiert.

1. PCR-Programm

1. - 40. Zyklus	94°C	30 s
	66°C	30 s
	72°C	3 min

Abkühlen auf 6°C.

2. PCR-Programm (touchdown PCR)

1. - 5. Zyklus	94°C	30 s
	72°C	3 min
6. - 10. Zyklus	94°C	30 s
	70°C	30 s
	72°C	3 min
11. - 35. Zyklus	94°C	30 s
	68°C	30 s
	72°C	3 min

Abkühlen auf 6°C.

Die Ergebnisse wurden mittels Gelelektrophorese (siehe 2.5.5) ausgewertet und die sichtbaren Banden ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 2.5.6). Anschließend wurden die Ligation und Transformation durchgeführt.

2.5.13.3. Primer

Primer-Name	Sequenz [5' → 3']	Schmelztemperatur T_m
3'GSP190	GATTACGCCAAGCTTCACACAATCTTCGTCGCTCCAGTTGTGC	> 75°C
5'GSP190	GATTACGCCAAGCTTTCCCGCCGCGGACGCTATCATGTTGAAG	> 75°C
3'GSP257	GATTACGCCAAGCTTGCGCCACCGGCAGTATGCACTCGCAC	> 75°C
5'GSP257	GATTACGCCAAGCTTAGGCGCTGCCGCGGAAGGGGAAAGTG	> 75°C

2.5.13.4. In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech)

Ligation und Transformation wurden mit diesem Kit gemacht. Dazu wurden

0,5 µl linearized pRACE vector
 3,5 µl aufgereinigtes RACE-Produkt
 1 µl In-Fusion HD Master Mix

in ein Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt. Die Inkubation der Lösung erfolgte bei 50°C für 15 min und wurde dann auf Eis abgekühlt. Zur Transformation wurden die Stellar Competent *E. coli* benutzt. Von diesen Zellen wurden 50 µl mit den 5 µl des Ligationsansatzes versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis, wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s durchgeführt. Abgekühlt wurde für 1 min auf Eis und dann wurden 450 µl SOC-Medium zugegeben. Die Suspension wurde 60 min bei 37°C und 300 UpM inkubiert, danach wurde die Bakteriensuspension 1:10 oder 1:50 mit SOC-Medium verdünnt. Diese Suspension wurde auf LB-Platten (2.3) mit Ampicillin verteilt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Übernachtskulturen und Plasmidpräparationen erfolgten wie in den Abschnitten 2.5.10 und 2.5.11 beschrieben.

2.5.13.5. Restriktionsverdau

Um zu beurteilen, ob die Ligation und Transformation erfolgreich war, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt.

0,5 µl EcoRI
 0,5 µl HindIII
 3 µl 2x Tango Buffer
 6 µl H₂O

Diese 10 µl wurden mit 5 µl Plasmid gemischt, über Nacht bei 37°C inkubiert und dann mittels Gelelektrophorese analysiert. Die Proben, die sichtbare Banden zeigten, wurden zum Sequenzieren geschickt.

2.5.14. Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) wurde durchgeführt, um die Expression verschiedener Gene während des Kulturverlaufs der Suspensionskultur zu beurteilen. Dazu wurde erst RNA von den Proben der Kulturcharakterisierung isoliert (2.5.2).

2.5.14.1. cDNA-Synthese

Aus der isolierten RNA wurde mit dem qScript cDNA SuperMix von Quanta cDNA synthetisiert. Als Endkonzentration der RNA in der Lösung wurde 0,1 µg gewählt:

4 µl	5x qScript cDNA SuperMix
x µl	RNA
y µl	H ₂ O (frei von Nukleasen)

Gesamtvolumen: 20 µl

Nach dem Mischen und Zentrifugieren wurden die Proben 5 min bei 25°C inkubiert. Dann wurde 30 min bei 42°C und weitere 5 min bei 85°C inkubiert. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt und die cDNA bei -20°C gelagert. Für die weiteren Versuche wurde ein Teil der cDNA mit TE-Puffer 1:5 verdünnt.

2.5.14.2. qPCR

Vor dem Einsetzen der Primer in der eigentlichen qPCR wurde erst eine Standard-PCR durchgeführt. Damit wurde die Qualität der Primer getestet (siehe 2.5.4.1).

Primer-Name	Sequenz [5' → 3']	Schmelztemperatur T_m
qActin-f	GATGGCCAGGTCATCACC	58,2°C
qActin-r	GTTGTAAGTGGTCTCGTGGA	57,3°C
qCa9OMT2-f	GCTGGCTGTTTAGTAGAGC	56,7°C
qCa9OMT2-r	AACCTTAGACGTGTTCCCAG	57,3°C
qVL-Mt-f	CATTGACCCATCACCTTCC	56,7°C
qVL-Mt-r	CCCGGAGGAAGATTGTTGAA	57,3°C
qCOMT2-f	GGGGAAAGTGATAGTGTGC	56,7°C
qCOMT2-r	GGGTTGTGCGCCAACATG	58,2°C

Actin wurde als Haushaltsgen (HKG) bestimmt.

Zunächst wurde die Effizienz der PCR-Reaktion bestimmt. Bei einer Effizienz von 100% soll die Menge an DNA sich bei jedem Zyklus verdoppeln. Die hier erreichte Effizienz soll über 95% liegen. Anschließend wurde auf dieser Grundlage die cDNA-Verdünnung für jedes Primerpaar ausgewählt. Für diesen Versuch wurden von den einzelnen Kulturtagen je 10 µl cDNA entnommen und gemischt. Von dieser Mischung wurden 40 µl 1:4 mit Wasser verdünnt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis eine Verdünnung von 1:256 erreicht wurde.

Für die qPCR wurde ein Master Mix hergestellt:

6,25 µl 2x PerfeCTa SYBR® Green SuperMix
 0,25 µl Primer-f
 0,25 µl Primer-r
 0,75 µl H₂O

Die verschiedenen Master Mixe wurden mit den cDNA-Verdünnungen gemischt und in Dreifach-Proben (je 12,5 µl) auf die 96-Well-Platten verteilt. Zusätzlich wurden Negativkontrollen (NTC) durchgeführt, indem statt 5 µl cDNA nur Wasser zugegeben wurde. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt.

qPCR-Programm:

95°C 2 min
 50 Zyklen: 95°C 15 s
 52°C 45 s
 68°C 1 min
 Schmelzkurve: 50°C - 95°C
 Abkühlen auf 6°C

Nach jedem der 50 Zyklen und nach der Schmelzkurve wurden die Daten erfasst.

Die Daten wurden ausgewertet und die optimale Verdünnung der cDNA berechnet. Mit diesen Verdünnungen wurde in den nächsten Versuchen weitergearbeitet.

Die Versuche wurden unter sterilen Bedingungen mit zweifach autoklavierten Materialien und Nuklease-freiem Wasser durchgeführt.

Anschließend wurde mit RNA eine PCR durchgeführt, um die RNA auf Spuren von gDNA zu testen. Dazu wurde eine Standard-PCR (2.5.4.1) mit 2 µl RNA und den Actin-Primern genutzt.

2.6. BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

2.6.1. Kaffeesäure O-Methyltransferase (COMT) aus *Linum album* und *Linum nodiflorum*

Die codierende Sequenz der Enzyme war in dem pRSET C-Vektor enthalten und dieser befand sich in den SoluBL21-Zellen. Die Sequenz der Methyltransferase aus *Linum nodiflorum* wurde von Stefan Wolters gefunden und in den Vektor und die Expressionszellen eingefügt.

2.6.1.1. Proteinexpression

Zur Expression der Methyltransferase wurde eine Übernachtskultur mit 5 ml LB-Medium und 25 µl Ampicillin (20 mg/ml) angelegt (2.5.10). Am nächsten Tag wurden 500 ml LB-Medium (mit 100 µg Ampicillin pro 1 ml Medium) mit der Übernachtskultur angeimpft und die Suspension bei 37°C und 220 UpM inkubiert, bis eine OD₆₀₀ zwischen 0,3 und 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurde die Proteinexpression mit 500 µl 1 M IPTG induziert und die Suspension erneut bei 26°C und 220 UpM für 18 h inkubiert. Um die Bakterien von dem Medium abzutrennen, wurden sie in mehreren Zentrifugengefäßen bei 4°C und 3000 g für 10 min abzentrifugiert. Ein Pellet entsprach einer Menge von 160-180 ml Medium. Die geernteten Bakterienpellets wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.6.1.2. Proteinaufreinigung

Die Bakterienpellets (1 Pellet entspricht etwa 160-180 ml Flüssigkultur) wurden auf Eis aufgetaut und dann in 6 ml His-Tag-Bindepuffer (50 mM KPi pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) resuspendiert. Um die Zellwand der Bakterien zu zerstören, wurde erst eine Spatelspitze Lysozym aus Hühnereiweiß zugegeben und die Suspension 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde ein Ultraschallaufschluss (Intensität 100%, Pulse 0,6) durchgeführt. Dieser wurde dreimal für 30 s unter ständigem Kühlen und mit Pausen von 30 s ausgeführt.

Danach wurde Zelltrümmer bei 4°C und 10000 g für 15 min abzentrifugiert. Für die His-Tag-Säulen wurden 1,5 ml His-Bind-Resin (gut gemischt) in die Säulen gegeben und die Flüssigkeit abtropfen lassen. Zum Äquilibrieren des Säulenmaterials wurde 1 ml His-Tag-Bindepuffer aufgefüllt und inkubiert. Vor Zugabe des Überstands wurde der Puffer wieder abgelassen. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation gleichmäßig auf die His-Tag-Säulen verteilt, und die Säulen wurden in einer waagerechten Position auf Eis 1 h geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Säulen wieder aufrecht verwendet und die Flüssigkeit durch Tropfen abfließen gelassen. Der Durchfluss wurde verworfen und das Säulenmaterial anschließend mit fünfmal je 2 ml Waschpuffer 1 (50 mM KPi pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gespült. Danach wurde das gebundene Protein durch eine Erhöhung der Imidazol-Konzentration dreimal mit je 1,25 ml Elutionspuffer (50 mM KPi pH 8, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. Während der Aufreinigung wurden von dem unlöslichen Rückstand, dem Durchfluss, den Waschfraktionen (W1 und W5) und allen Elutionsfraktionen Proben für eine SDS-PAGE (2.6.4) entnommen.

Um unerwünschte Salze aus der Enzymlösung zu entfernen, wurde eine Umpufferung in 20 mM KPi pH 7 mit PD-10 Säulen von GE Healthcare Life Sciences (für ein Probenvolumen von 2,5 ml) durchgeführt. Die Enzymlösung wurde nach der Elution mit 1 mM DTT versetzt, in 500 µl aliquotiert und mit 15% Glycerin gemischt. Nach dem Einfrieren mit flüssigem N₂ wurden die Enzymlösungen bei -20°C gelagert.

2.6.2. Mutanten der Coniferylalkohol 9-O-Methyltransferase

Als Expressionsvektor diente hier pET15b und als Expressionszellen *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

2.6.2.1. Proteinexpression

Die Expression wurde ebenfalls mit der Herstellung einer Übernachtskultur begonnen. Dazu wurden 5 ml LB-Medium und 25 µl Ampicillin (20 mg/ml) verwendet. Die weitere Vorgehensweise wird in Abschnitt 2.5.10 beschrieben. Als Nächstes wurden 500 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit der Kultur angeimpft. Um eine OD₆₀₀ von 0,4 zu erreichen, wurde bei 37°C und 220 UpM im Schüttler inkubiert. Um eine Überproduktion der Methyltransferasen zu aktivieren, wurde mit 1 mM IPTG induziert. Anschließend wurde bei 37°C und 220 UpM für 5 h inkubiert und danach die Bakterien abzentrifugiert. Die Zentrifugation fand bei 4°C, 3000 g und 10 min statt. Die Bakterienpellets wurden mit flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.6.2.2. Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung wurde begonnen wie in Abschnitt 2.6.1.2 erklärt. Nach dem Aufschluss wurde die Zentrifugation bei 4°C und 5000 g für 30 min durchgeführt und im Anschluss der Überstand auf die His-Tag-Säulen gegeben. Die Säulen wurden mit 1 ml His-Bind-Resin gefüllt und mit His-Tag-Bindepuffer äquilibriert. Diese gefüllten Säulen wurden 1 h unter Schütteln auf Eis inkubiert und anschließend der Durchfluss verworfen. Gewaschen wurden die Säulen erst achtmal mit je 2 ml Waschpuffer 1 und danach noch zweimal mit je 1 ml Waschpuffer 2 (50 mM KPi pH 8, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol). Das Eluieren des Proteins erfolgte dreimal mit je 1 ml Elutionspuffer. Bei der Aufreinigung wurden Proben des unlöslichen Rückstands, des Durchflusses, der Waschfraktionen (W1, W8 und W10) und der Elutionsfraktionen für die SDS-PAGE (2.6.4) gesammelt. Die Umpufferung und der restliche Ablauf erfolgte wie in Abschnitt 2.6.1.2 beschrieben.

2.6.3. Methyltransferasen LnMT3 und LnMT3s

Der Expressionsvektor und die Expressionszellen stimmten mit denen überein, die für die Coniferylalkohol 9-O-Methyltransferase benutzt wurden.

2.6.3.1. Proteinexpression

Die Überexpression dieser Enzyme wurde ebenso ausgeführt wie in Abschnitt 2.6.2.1 dargestellt.

2.6.3.2. Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung wurde durchgeführt, wie in dem Abschnitt 2.6.2.2 geschildert.

2.6.4. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Lämmli (1970) durchgeführt. Die Proteine werden dabei denaturiert und bilden einen Protein-SDS-Komplex. Dieser Komplex ist negativ geladen und wandert je nach Größe unterschiedlich weit im elektrischen Feld.

Nach dem Aufreinigen der Proteine wurde mit den gesammelten Proben eine SDS-PAGE durchgeführt, um die Qualität und Reinheit zu beurteilen. Das Polyacrylamidgel wurde hergestellt, indem zuerst das Trenngel und auf dieses das Sammelgel gegossen wurde.

Zusammensetzung Trenngel:

1,25 ml	Trenngel-Puffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8)
1,45 ml	H ₂ O
2,05 ml	Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)
0,2 ml	SDS (10%)
8 µl	TEMED
35 µl	Ammoniumpersulfat APS (10%)

Der Radikalstarter APS wurde als Letztes zugegeben, und die Lösung wurde, nach dem Mischen, in die Form gefüllt. Das Gel wurde mit 0,5 ml n-Butanol bedeckt, um den Luftsauerstoff fern zu halten und die Oberfläche zu glätten. Nach Aushärten des Trenngels wurde das Butanol entfernt und das Sammelgel gemischt.

Zusammensetzung Sammelgel:

625 µl	Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8)
1,4 ml	H ₂ O
375 µl	Rotiphorese Gel 30
100 µl	SDS (10%)
5 µl	TEMED
20 µl	APS (10%)

Das Sammelgel wurde über das Trenngel geschichtet und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach Auspolymerisieren wurde es über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Das Gel wurde in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und diese mit Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl, 0,1% SDS, pH 8,3) gefüllt. Von den gesammelten Proben wurden 10 µl entnommen und mit 5 µl Roti-Load 4x versetzt. Die Proben wurden 10 min bei 95°C denaturiert und in die Geltaschen gefüllt. Die enthaltenen Proteine wurden etwa 2 h bei 150 V und 100 mA aufgetrennt.

Um die Banden im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel in einer Coomassie-Färbelösung (112,5 ml Methanol, 112,5 ml H₂O, 25 ml Eisessig, 0,125% Coomassie Blau R-250) 1 h unter Schütteln gefärbt. Anschließend wurde das Gel mit einer Entfärbelösung (450 ml Methanol, 450 ml H₂O, 100 ml Eisessig) entfärbt.

2.6.5. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Ermittlung der Proteinmenge erfolgte mit dem Bradford-Assay (Bradford, 1976). Dabei bildet das in der Bradford-Lösung enthaltene Coomassie Blau G-250 mit Proteinen einen Komplex, der das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Die Bradford-Lösung setzte sich aus 100 mg Coomassie Blau G-250, 50 ml EtOH, 100 ml o-Phosphorsäure (85%) und 850 ml H₂O zusammen.

Für den Assay wurde 2 ml Bradford-Lösung in eine Küvette gefüllt und mit 20 µl Probe versetzt und gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation wurde die photometrische Messung durchgeführt. Zur Referenz wurden 20 µl Puffer (20 mM KPi pH 7) anstelle der Probe gegeben. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden verschiedene Konzentrationen von BSA (0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml) eingesetzt.

2.6.6. Enzymtests mit Mutanten der Coniferylalkohol 9-O-Methyltransferase

2.6.6.1. Herstellung des Coniferylalkohol-9-Methylethers (Ca9Me)

Die Herstellung des Standards Ca9Me wurde mit mehreren Enzymtests des Ca9OMT-Wildtyps begonnen.

Zusammensetzung:

10 µl	Coniferylalkohol [10 mM in MeOH]
10 µl	SAM [25 mM]
x µl	Enzym [40 µg Protein]
y µl	0,1 M KPi pH 7 + 1 mM DTT
<hr/>	
400 µl	

Der Test wurde 4 h bzw. 5 h bei 30°C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion mit 400 µl Ethylacetat beendet. Insgesamt wurde dreimal mit 400 µl Ethylacetat ausgeschüttelt und anschließend das Lösungsmittel entfernt.

Zur Auswertung wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Als Laufmittel wurde eine 1:1-Mischung aus Ethylacetat und Petrolether (Siedebereich 40°C-60°C) und als DC-Platte eine Kieselgel 60 F254 von Merck benutzt. Bei einer Wellenlänge von 254 nm wurde die Bande von Ca9Me durch Fluoreszenzlöschung identifiziert. Das Kieselgel wurde von der DC-Platte getrennt und in einem Reaktionsgefäß gesammelt.

Je 100 mg Kieselgel wurden mit 1 ml Methanol gemischt, um das Ca9Me zu extrahieren. Nach einer Zentrifugation bei 16000 g für 15 min, wurde der Überstand entnommen und in einem Rundkolben gesammelt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Der Überstand wurde mittels Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand in 1 ml Methanol rückgelöst. Der Gehalt der Lösung wurde mit dem Photometer bestimmt. Dazu wurde die Probe 1:200 verdünnt und bei einer Wellenlänge von 268 nm in einer Quarzküvette vermessen. Bei einer zu geringen Konzentration an Ca9Me wurde erneut das Methanol entfernt und der Rückstand in weniger Methanol rückgelöst. Zur Berechnung der Konzentration wurde der Extinktionskoeffizient ϵ von $\log \epsilon = 4,09$ (Naito et al., 1992) und das Lambert-Beer'sche Gesetz angewendet:

$$E = \epsilon * c * d$$

E: Extinktion

c: Konzentration

ϵ : Extinktionskoeffizient

d: Schichtdicke der Küvette

2.6.6.2. Enzymtests

Zu Beginn wurden mehrere Enzymtests durchgeführt, um die Aktivität der Mutanten C271A, C271S, D272N und Y162F zu beurteilen.

10 μ l	Coniferylalkohol [10 mM]
10 μ l	SAM [25 mM]
x μ l	Enzym-Lösung
y μ l	0,1 M KPi pH 7 + 1 mM DTT
<hr/>	
400 μ l	

Die Proteinkonzentration und die Inkubationszeit wurden variiert, und die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 30°C. Die Reaktion wurde mit 400 μ l Ethylacetat abgestoppt und die Produkte noch weitere zwei Mal mit 400 μ l Ethylacetat ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die Proben für die Messung in 40% Methanol rückgelöst.

Für die Mutanten C271A und C271S wurden die K_m -Werte bestimmt. Zuerst wurde dafür die optimale Enzymkonzentration bzw. optimale Inkubationszeit mit Enzymtests ermittelt.

Ausgewertet wurden alle Enzymtests über HPLC. Als Laufmittel diente 40% Methanol mit 0,01% Phosphorsäure angesäuert, und es wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Die Säule war eine Equisil ODS C18 (5 μ , 250 x 4 mm) mit einer 20 mm-Vorsäule desselben Materials.

Bestimmung des K_m -Wertes

Der K_m -Wert wird ermittelt, um die Affinität des Substrats zum Enzym zu messen. Der Wert wird definiert als die Substratkonzentration, bei der eine halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird. Um diesen Wert zu bestimmen, wurde die Konzentration eines Substrats (Coniferylalkohol bzw. SAM) verändert, während das jeweils andere Substrat in gleichbleibender sättigender Konzentration eingesetzt wurde.

2.6.7. Enzymtests mit Kaffeesäure O-Methyltransferasen

Getestet wurden neben den LnCOMT1 und LnCOMT2 aus *Linum nodiflorum*, auch die LaCOMT aus *Linum album*. Hier war das Ziel, die Substrate der Enzyme zu identifizieren.

Der Enzymtest hatte insgesamt ein Volumen von 250 μ l und setzte sich folgendermaßen zusammen:

10 μ l	SAM [25 mM]
x μ l	Substrat [Endkonzentration: 200 μ M]
150 μ l	Enzymlösung
y μ l	0,1 M KPi pH 7 + 1 mM DTT
<hr/>	
250 μ l	

Alle Tests wurden bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Als Inkubationszeiten wurden 0, 30 und 60 min gewählt. Beendet wurden die Reaktionen mit 20 μ l 6 N HCl und anschließend dreimal mit je 500 μ l Ethylacetat ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die Proben bei -20°C aufbewahrt.

Die Proben wurden in 100 μ l 50% Methanol gelöst und mittels HPLC analysiert. Als Laufmittel diente 50% Methanol mit 0,01% Phosphorsäure und die in 2.6.6.2 beschriebene Säule benutzt. Die Wellenlängen, bei denen gemessen wurde, werden im Abschnitt 2.6.7.1 angegeben.

2.6.7.1. Substrate

LnCOMT:

Substrat	Lösungsmittel	Wellenlänge [nm]
β-Peltatin	Methanol	280
4'-Demethylpodophyllotoxin	Methanol	280
4-Cumarsäure	Methanol	333
4-Demethylecatechin	Methanol	280
Chlorogensäure	Methanol	330
Ferulasäure	Methanol	325, 330
Hydroxymatairesinol	Methanol	280
Isoferulasäure	Methanol	325, 330
Kaffeesäure	Methanol	325, 330
Matairesinol	50% Methanol	280
Sinapylalkohol	Methanol	280

LaCOMT:

Substrat	Lösungsmittel	Wellenlänge [nm]
Ferulasäure	Methanol	325, 330
Isoferulasäure	Methanol	325, 330
Kaffeesäure	Methanol	325, 330
Matairesinol	50% Methanol	280

2.6.7.2. Dünnschichtchromatographie

Für die DC wurden Enzymtests mit der LnCOMT und Kaffeesäure durchgeführt. Die Proben wurden 0 und 6 h inkubiert, und das weitere Vorgehen entsprach der Beschreibung im Abschnitt 2.6.7. Das Laufmittel für die DC setzte sich aus Chloroform, Methanol und Ameisensäure im Verhältnis 85:15:1 (Mabinya et al., 2006) zusammen. Die DC-Platte war eine Kieselgel 60 F254 Platte von Merck.

Nach Entwicklung der Platte wurde sie zur Detektion mit Naturstoffreagenz A (1% in Methanol) und PEG 4000 (5% in Methanol) besprüht. Eine Auswertung erfolgte unter UV-Licht bei 366 nm.

2.6.7.3. Enzymtests LaCOMT

1. Optimale Proteinkonzentration

Für diesen Enzymtest wurde die Menge an Protein variiert. Es wurden 0, 5, 10, 15, 20 und 30 µg Protein in den Tests eingesetzt.

Der Standardtest wurde umgeändert, sodass eine Endkonzentration von 1,25 mM SAM und 2 µM Kaffeesäure erreicht wurde. Die Inkubationszeit betrug 5 min bei einer Temperatur von 30°C. Die weitere Durchführung entsprach dem oben beschriebenen Vorgehen.

Alle Proben wurden in 100 µl 40% Methanol gelöst. Im Unterschied zur oben genannten HPLC-Methode wurde als Laufmittel 40% Methanol mit 0,01% Phosphorsäure gewählt.

2. Optimale Inkubationszeit

Bei diesem Test wurden die Inkubationszeiten verändert. Gewählt wurden 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 min. Als Proteinmenge wurden 10 µg eingesetzt und die restlichen Parameter wurden nicht verändert.

3. Optimaler pH-Wert

Ein erster Enzymtest wurde mit einem Britton-Robinson-Puffer (0,04 M H_3BO_3 , 0,04 M H_3PO_4 , 0,04 M Essigsäure eingestellt mit 0,2 M NaOH) durchgeführt, der auf verschiedene pH-Werte von 2 bis 12 eingestellt war. Wiederholt wurde der Test mit einem KPi-Puffer, eingestellt auf die pH-Werte 6 bis 8. Die eingesetzte Proteinmenge war 10 µg, außerdem wurde eine Endkonzentration von 20 µM Kaffeesäure und eine Inkubationszeit von 5 min gewählt.

4. Optimale Inkubationstemperatur

Die Inkubationstemperatur wurde hier verändert, dabei wurden 0°C (Eis), 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C und 60°C gewählt. Der Test wurde im Thermomixer von Eppendorf durchgeführt. Die eingesetzte Menge an Protein und Kaffeesäure entsprachen dem vorherigen Test.

5. Bestimmung des K_m -Wertes

Siehe 2.6.6.2.

2.6.8. Enzymtests mit den Methyltransferasen LnMT3 und LnMT3s

Die Methyltransferasen LnMT3 und LnMT3s wurden in *Linum nodiflorum* gefunden. Die zwei Methyltransferasen unterscheiden sich in ihrem Startcodon, das aus der ermittelten Sequenz nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Ziel der durchgeführten Enzymtests war die Identifizierung des Substrats und ob ein Unterschied in der Aktivität der beiden Methyltransferasen besteht.

Der Standardenzymtest bestand aus folgenden Komponenten:

10 µl	SAM [25 mM]
x µl	Substrat [Endkonzentration: 200 µM]
150 µl	Enzymlösung [LnMT3: 60-67,5 µg; LnMT3s: 52,5-57 µg]
y µl	0,1 M KPi pH 7 + 1 mM DTT
250 µl	

Die Proben wurden im Wasserbad bei 30°C und für unterschiedliche Zeiten (0, 30, 60 min bzw. 0 h - 5 h) inkubiert. Die Reaktion wurde mit 20 µl 6 N HCl beendet und dreimal mit 500 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels, wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Die Auswertung der Enzymtests erfolgte mit einer HPLC. Das Laufmittel war 50% Methanol angesäuert mit 0,01% Phosphorsäure, die Säule eine Equisil ODS C18 (siehe 2.6.6.2) und die eingestellte Wellenlänge variierte je nach Substrat.

Die Auswertung der Tests mit Flavonoiden als Substrat wurde mittels HPLC mit einem Gradienten durchgeführt. Laufmittel A war Wasser mit 0,1% Ameisensäure und als Laufmittel B diente Acetonitril, auch mit 0,1% Ameisensäure angesäuert. Die Säule war die HyPURITY Elite C18 5 µ 250 x 4 mm.

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]	Flussrate [ml/min]
0	95	5	0,8
40	0	100	0,8
45	0	100	0,8
45,1	95	5	0,8
55	95	5	0,8

2.6.8.1. Substrate:

Substrat	Lösungsmittel	Wellenlänge [nm]
β-Peltatin	Methanol	280
4-Cumarsäure	Methanol	333
4-Demethylyatein	Methanol	280
Catechin	Methanol	276, 280
Chlorogensäure	Methanol	330
Chrysin	Methanol	314
Eriodictyol	Methanol	290
Ferulasäure	Methanol	330
Galangin	Methanol	266; 268
Hesperetin	Methanol	290
Homoeriodictyol	Methanol	290
Hydroxymatairesinol	Methanol	280
Kaempferol	Methanol	260
Kaffeesäure	Methanol	330
Luteolin-7-Glucosid	Methanol	350
Matairesinol	50% Methanol	280
Naringenin	Methanol	290
Quercetin-Dihydrat	Methanol	370
Resorcin	Wasser	280
Sinapylalkohol	Methanol	280
Xanthin	Basisches Wasser	270

Bei dem Enzymtest mit Xanthin wurde die Vorgehensweise geändert, indem mit 250 µl Methanol abgestoppt wurde und diese Lösung anschließend direkt für die HPLC-Messung benutzt wurde. Das Laufmittel wurde zwischen 10% und 50% Methanol mit 0,01% Phosphorsäure variiert.

2.6.9. LC-MS

Die Analyse verschiedener Enzymtests wurde zusätzlich mittels LC-MS durchgeführt. Dies diente zur weiteren Identifikation der entstandenen Produkte.

Als Säule wurde die Multospher 120 RP 18 (5 µ 250 x 2 mm von CS-Chromatographie Service GmbH) verwendet. Die mobile Phase bestand aus einem Gradienten aus Wasser angesäuert

mit 0,1% Ameisensäure und Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure. Es wurde mit einer positiven Ionisation gemessen.

Zeit [min]	H ₂ O + 0,1% Ameisensäure [%]	ACN + 0,1% Ameisensäure [%]	Flussrate [ml/min]	Temperatur [°C]
0,00	95	5	0,25	20
40,00	0	100	0,25	20
45,00	0	100	0,25	20
45,10	95	5	0,25	20
55,00	95	5	0,25	20

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. ANLEGEN VON KALLUS- UND SUSPENSIONSKULTUREN

Zu Beginn wurden von *Linum nodiflorum* Kallus- und Suspensionskulturen angelegt, um mit diesen Zellen weitere Untersuchungen durchzuführen. Dabei ist es gelungen, zwei Kulturen in MSLi-Medium (Ln1 und Ln2) und jeweils eine Kultur in CB2- und B5-Medium (Ln CB2 bzw. Ln B5) anzulegen. Diese sollten anschließend bezüglich ihres Lignangehalts verglichen werden. Von den Arten *Linum album* und *Linum flavum* existierten bereits Suspensionskulturen, sodass diese für die Experimente verwendet wurden.

3.2. LIGNANEXTRAKTION

Zur Untersuchung des Lignangehalts der angelegten Kulturen, wurden die Zellen an Tag 7 geerntet. Diese Zellen wurden gefriergetrocknet und für die Lignanextraktion verwendet. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Extraktion für verschiedene Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum*. Eine Extraktion der Kulturen in MSLi wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Die Lignane wurden einmal kurz nach Anlegen der Kulturen von Ln1 und Ln2 am 12.11.2013 und danach nochmal von Ln1 am 06.11.2016 und Ln2 am 04.11.2016 geerntet. Die Auswertung der Extraktion zeigte, dass Ln2-131112 als einzige Kultur Podophyllotoxin (PTOX) enthält. Die Konzentration entspricht 0,144% des Trockengewichts (TG). Hinsichtlich des Lignans 6-Methoxypodophyllotoxin (MPTOX) ließ sich feststellen, dass es in allen Suspensionskulturen zu finden ist. Die höchste Menge ist ebenfalls in Ln2-131112 mit 0,047% des TG zu finden. Die Kulturen Ln B5 und Ln CB2 enthielten von den untersuchten Lignanen nur MPTOX, dieses aber nur in sehr geringen Mengen. Dies deutet darauf hin, dass sich die Medien B5 und CB2 hier negativ auf die Bildung dieser Lignane in den Kulturen auswirkten. Die Konzentration von Desoxypodophyllotoxin (DOP) war in der Suspensionskultur Ln1-131112 am größten. Hier ist der Gehalt 0,084% des TG. In der Kultur Ln2-131112 liegt sie bei nur 0,016% des TG.

Im Vergleich zu den im Jahr 2013 geernteten Zellen konnten in Ln1-161106 und Ln2-161104 nur noch Spuren der Lignane nachgewiesen werden. In Ln1-161106 konnte nur MPTOX und in Ln2-161104 MPTOX und DOP gefunden werden. Diese Abnahme der Konzentration ist auf das Alter der Kulturen und die damit verbundene Selektion zu schnell wachsenden Zellen, die weniger Stoffe produzieren, zurückzuführen.

In der Literatur wurde in Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* eine höhere Konzentration an 6-Methoxypodophyllotoxin beschrieben. Hier akkumulierte die Kultur bis zu 0,6% des TG an Tag 12 und bis zu und 0,18% des TG an Tag 20, wobei die Kulturen nur etwa 0,05% des TG an DOP enthielten (Konuklugil et al., 1999; Petersen und Alfermann, 2001). Im Vergleich dazu enthalten die getesteten Kulturen wenig MPTOX und die Kultur Ln2 mehr PTOX als MPTOX. Die geringe Konzentration der Endprodukte MPTOX und PTOX in Ln1-131112 kann durch eine verminderte Umsetzung der Vorstufe DOP erklärt werden. Es muss letztlich auch berücksichtigt werden, dass die Literaturdaten von deutlich älteren Kulturen stammen. Eine spätere Ernte der in dieser Arbeit beschriebenen Kulturen hätte möglicherweise höhere Lignangehalte ergeben.

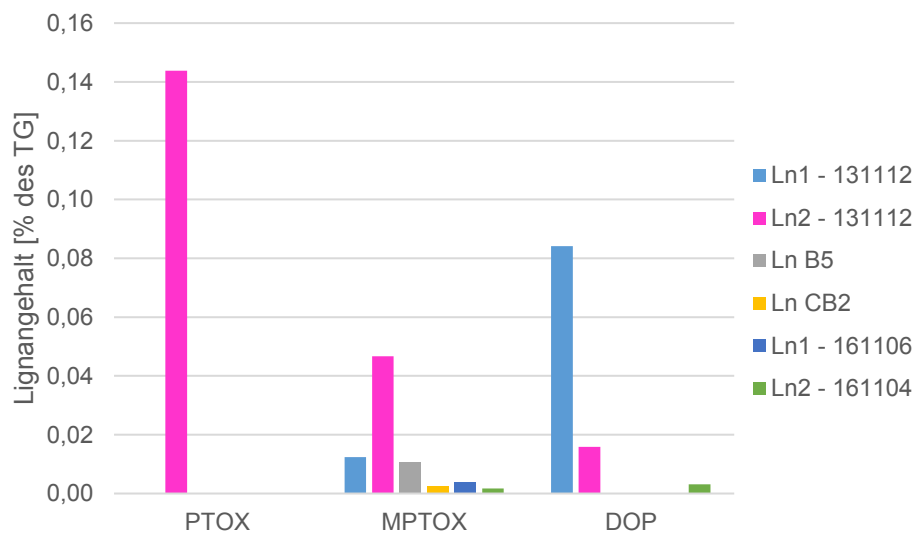


ABBILDUNG 13

Gehalt an Podophyllotoxin (PTOX), 6-Methoxypodophyllotoxin (MPTOX) und Desoxypodophyllotoxin (DOP) der einzelnen Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum*.

Die Lignanextraktion wurde auch für die Suspensionskulturen von *Linum album* und *Linum flavum* durchgeführt. In der Kultur von *Linum album* wurden keine der getesteten Lignane gefunden. Die Ursache dafür kann auch hier das Alter der Suspensionskultur sein. In den Zellen von *Linum flavum* wurde nur MPTOX mit einer Menge von 0,04% des Trockengewichts gefunden. Dies stimmt mit der Literatur überein, die zeigten, dass *Linum flavum*-Kulturen hauptsächlich MPTOX akkumulieren (van Uden et al., 1990; Wichers et al., 1990).

3.3. ELICITIERUNG

In Pflanzen erfüllen Lignane vor allem bei der Abwehr von Infektionen und Fraßfeinden eine wichtige Rolle (Nakatani et al., 1988; Lewis und Davin, 1999; Harmatha und Dinan, 2003; Gao et al., 2004). Um in Suspensionskulturen die Menge an Sekundärstoffen zu erhöhen, werden sogenannte Elicitoren eingesetzt, die Abwehrmechanismen auslösen und damit auch eine vermehrte Bildung von bestimmten Sekundärstoffen. Zur Elicitierung können verschiedene Stoffe benutzt werden, wobei bei den hier durchgeführten Elicitierungsversuchen Methyljasmonat zum Einsatz kam. Die Untersuchungen wurden mit den zwei *Linum nodiflorum*-Suspensionskulturen in MSLi-Medium durchgeführt. Die hier dargestellten Versuche sind als Vorversuche anzusehen, die bei einem positiven Effekt wiederholt und statistisch abgesichert worden wären.

3.3.1. *Linum nodiflorum* Suspensionskultur 1

Die Suspensionskultur Ln1 wurde nach der Zugabe des Methyljasmonats (MeJa; 100 μ M) bzw. des Lösungsmittels Ethanol (EtOH) als Kontrolle an den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h und 240 h geerntet.

In der Abbildung 14 werden die Ergebnisse für Podophyllotoxin dargestellt. Der Verlauf zeigte keine Erhöhung der Konzentration durch Elicitorzugabe. Die Resultate für 6-Methoxypodophyllotoxin und Desoxypodophyllotoxin (Abbildung 15 und Abbildung 16) zeigten einen ähnlichen Verlauf der EtOH- und MeJa-Gruppe und keine eindeutige Erhöhung der Menge an Lignanen durch die Elicitorzugabe.

3. Ergebnisse und Diskussion

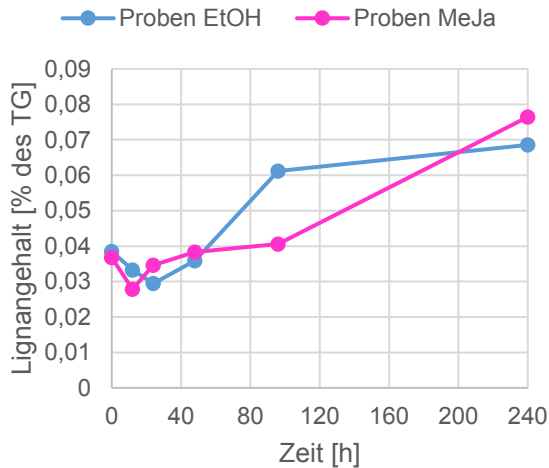


ABBILDUNG 14

Verlauf des Gehalts an Podophyllotoxin in Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* (Ln1) nach EtOH- und MeJa-Zugabe.

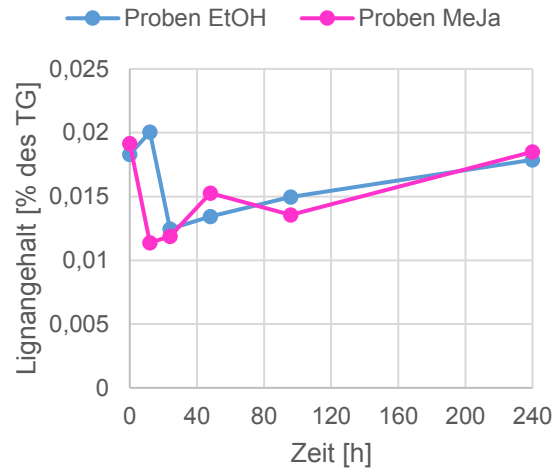


ABBILDUNG 15

Verlauf des Gehalts an 6-Methoxypodophyllotoxin in Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* (Ln1) nach EtOH- und MeJa-Zugabe.

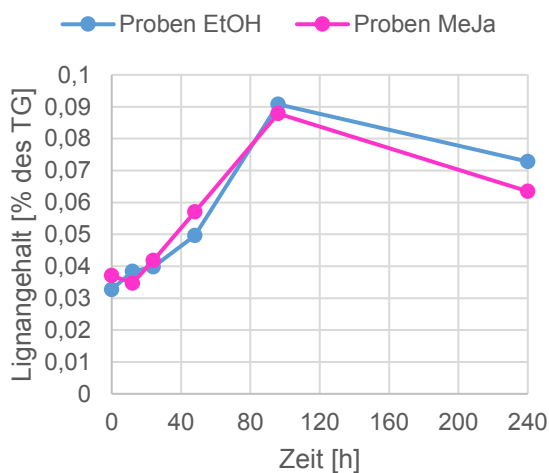


ABBILDUNG 16

Verlauf des Gehalts an Desoxypodophyllotoxin in Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* (Ln1) nach EtOH- und MeJa-Zugabe.

Eine zweite Elicitierung wurde durchgeführt, um die Entwicklung zwischen 96 h und 240 h Inkubation näher zu untersuchen. Für diesen Versuch wurde eine neu angelegte Suspensionskultur verwendet, da die alte Kultur auf Grund einer Infektion vernichtet worden war. Dies erklärt vor allem die unterschiedliche Konzentration an Lignanen, insbesondere an Desoxypodophyllotoxin im Vergleich zur ersten Elicitierung.

In Abbildung 17 ist der Verlauf des Podophyllotoxingehalts zu sehen. Hier war ein deutlicher Unterschied zwischen der elicitierten Kultur und der Kontrollkultur zu erkennen. In der

Kontrollgruppe konnte eine höhere Konzentration von Podophyllotoxin gefunden werden. Erklärbar ist dieses Phänomen durch eine mögliche Stimulation der Produktion anderer Stoffe, die in der Analyse der Chromatogramme nicht identifiziert werden konnten. Hinsichtlich der Konzentration an 6-Methoxypodophyllotoxin zeigt die Abbildung 18 einen ähnlichen Verlauf der beiden Kulturen, wobei an den Tagen 4 und 10 ein leicht erhöhter Gehalt in der Kultur mit Elicitor erkennbar ist. Für den Desoxypodophyllotoxin-Gehalt war ein Unterschied an Tag 10 zu beobachten, mit einer höheren Konzentration nach Elicitierung (siehe Abbildung 19). Der generelle Verlauf der Kurven war jedoch bei beiden Gruppen ähnlich.

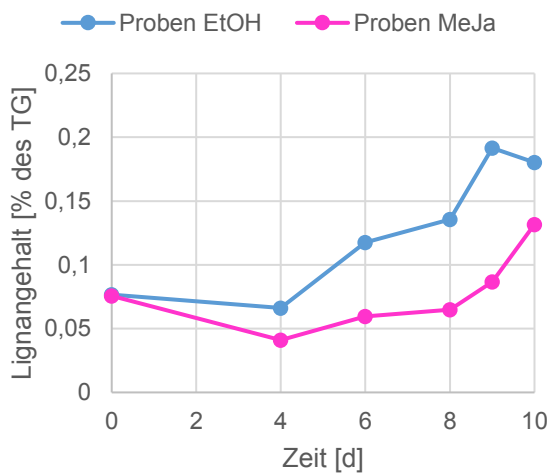


ABBILDUNG 17

Verlauf des Gehalts an Podophyllotoxin in Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* (Ln1) nach EtOH- und MeJa-Zugabe.

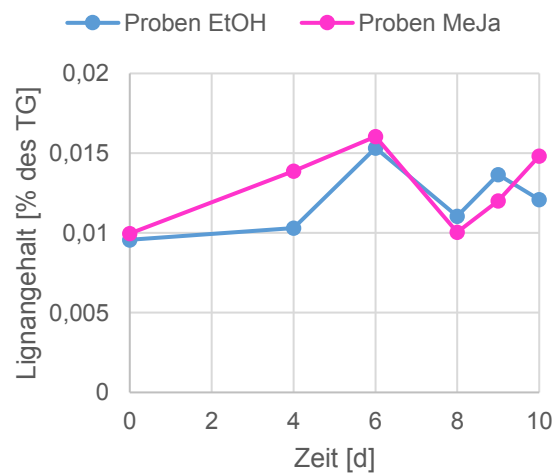
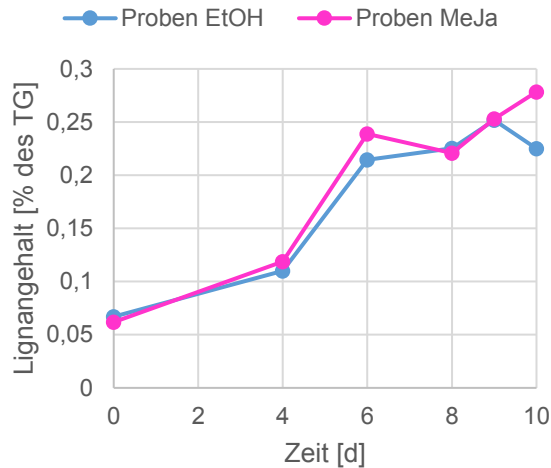


ABBILDUNG 18

Verlauf des Gehalts an 6-Methoxypodophyllotoxin in Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* (Ln1) nach EtOH- und MeJa-Zugabe.

**ABBILDUNG 19**

Verlauf des Gehalts an Desoxypodophyllotoxin in Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* (Ln1) nach EtOH- und MeJa-Zugabe.

3.3.2. *Linum nodiflorum* Suspensionskultur 2

Die Untersuchung der zweiten Suspensionskultur Ln2 erfolgte gemäß der ersten Elicitierung von Ln1. Podophyllotoxin zeigte in Abbildung 20 den gleichen Verlauf der Proben mit MeJa und EtOH, wobei die Kultur mit MeJa ab 48 h eine leicht erhöhte Konzentration um etwa 0,015% aufwies. In Abbildung 21 lässt sich keine eindeutige Wirkung des Elicitors auf den Gehalt von 6-Methoxypodophyllotoxin erkennen. Desoxypodophyllotoxin zeigte wie Podophyllotoxin eine Erhöhung der Konzentration nach Elicitorzugabe ab einer Inkubationszeit von 48 h. Dabei blieb aber der Verlauf der MeJa- und EtOH-Gruppe mit einem Maximum nach 96 h ähnlich (Abbildung 22).

3. Ergebnisse und Diskussion

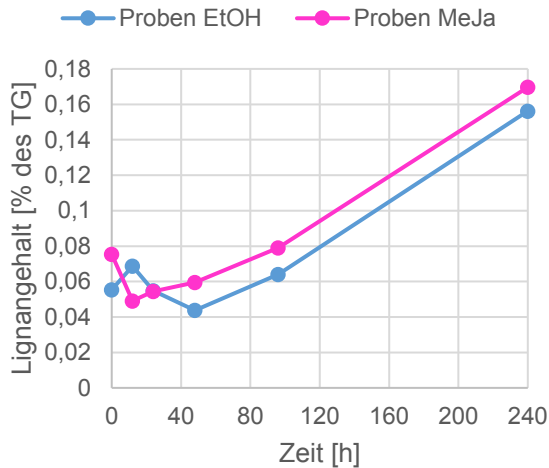


ABBILDUNG 20

Verlauf des Gehalts an Podophyllotoxin in Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* (Ln2) nach EtOH- und MeJa-Zugabe.

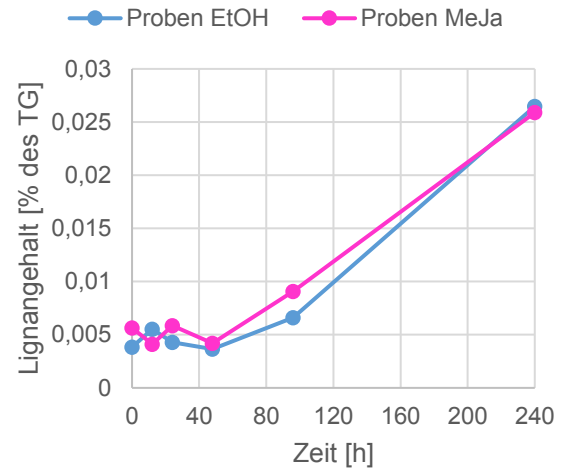


ABBILDUNG 21

Verlauf des Gehalts an 6-Methoxypodophyllotoxin in Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* (Ln2) nach EtOH- und MeJa-Zugabe.

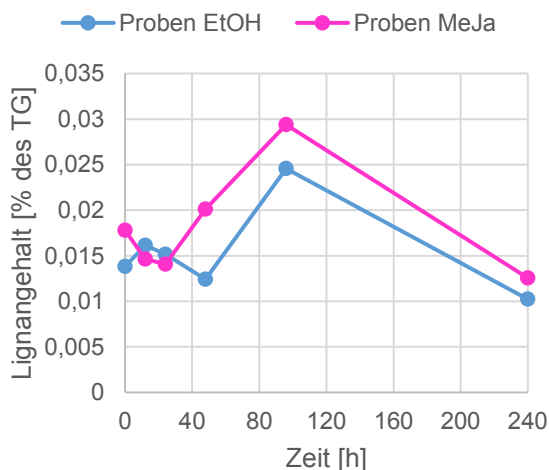


ABBILDUNG 22

Verlauf des Gehalts an Desoxypodophyllotoxin in Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum* (Ln2) nach EtOH- und MeJa-Zugabe.

In der Literatur wurde bei der Elicitierung einer Suspensionkultur von *Linum nodiflorum* eine Erhöhung des MPTOX-Gehalts von 1,4% des Trockengewichts an Tag 10 erreicht (Berim et al., 2005). Bei van Fürden et al. (2005), die die Elicitierung bei *Linum album*-Kulturen durchgeführt hat, zeigte sich schon ein Anstieg der Konzentrationen von PTOX und MPTOX innerhalb des 1. Tages nach der Zugabe von MeJa zu den Kulturen. Hier erreichte man einen Anstieg des PTOX-Gehalts um das 2- bis 10-fache des Ausgangswerts an Tag 12 (abhängig von der jeweiligen Kultur). Schlussfolgern lässt sich aus diesen Ergebnissen, dass die

Elicitierung bei den von uns angelegten Kulturen nicht den gewünschten Effekt hatte und bei keiner der getesteten Kulturen eine signifikante Erhöhung des PTOX-, MPTOX- oder DOP-Gehalts stattfand.

3.4. KULTURCHARAKTERISIERUNG

Die Kulturcharakterisierung wurde mit der Suspensionskultur Ln1 über einen Zeitraum von 14 Tagen (Tag 0 bis Tag 13) durchgeführt. Diese Untersuchung hatte das Ziel, die Entwicklung der Kultur in dieser Zeit zu beobachten.

3.4.1. Mediumsparameter

Als Mediumsparameter wurden Leitfähigkeit, Zuckergehalt und pH-Wert ermittelt. Die Ergebnisse der Bestimmungen werden in Abbildung 23 gezeigt.

Der pH-Wert des Mediums stieg von 5,5 auf einen Wert von 7,15 an Tag 7 an. Danach sank er auf 6,5 ab und stieg bis zum Ende der Charakterisierung kontinuierlich an.

Im Gegensatz dazu nahm der Zuckergehalt des Mediums von 3% stetig ab, bis am 7. Tag 0% erreicht wurde. Dies lässt sich durch die Aufnahme von Zucker als Energiequelle erklären. Ab Tag 10 stieg die Kurve wieder leicht bis auf 0,3% an. Zu beachten ist, dass bei der Bestimmung des Zuckergehalts über den Brechungsindex auch andere Substanzen berücksichtigt werden, die lichtbrechende Eigenschaften besitzen. Diese werden nach dem Absterben von Zellen freigesetzt, sodass der Wert am Ende wieder leicht ansteigt.

Die Leitfähigkeit des Mediums sank kontinuierlich und hatte an Tag 11 mit 2,04 mS/cm seinen tiefsten Wert, danach stieg die Kurve wieder auf 2,56 mS/cm leicht an. Auch dieser Verlauf ist durch die Aufnahme von Ionen in die Zellen und die Freisetzung nach dem Absterben der Zellen zu erklären.

In Bezug auf diese Werte bestätigt sich, dass die Überimpfung der Zellen an Tag 7 den optimalen Zeitpunkt für das Überführen in neues Medium darstellt.

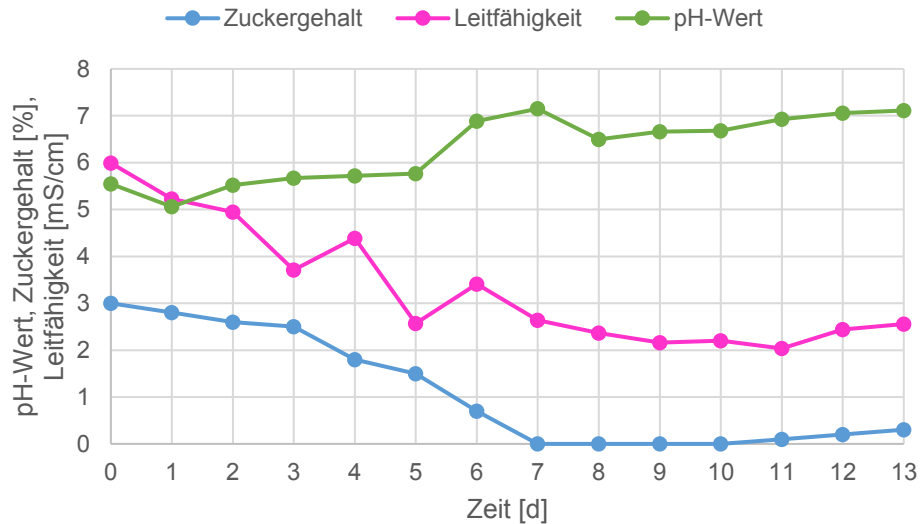


ABBILDUNG 23

Verlauf der Mediumsparameter pH-Wert, Zuckergehalt und Leitfähigkeit während der Kulturcharakterisierung der Suspensionskultur von *Linum nodiflorum* (Ln1).

3.4.2. Zellparameter

Als Zellparameter wurden das Frischgewicht und das Gewicht nach der Gefriertrocknung bestimmt.

In Abbildung 24 sind die Kurven des Frisch- und des Trockengewichts zur besseren Vergleichbarkeit gemeinsam aufgetragen. Hier ist zu erkennen, dass das Trockengewicht der Zellen ein Maximum von 0,85 g pro Kolben an Tag 7 erreicht hat. Danach fiel das Gewicht auf etwa 0,57 g ab. Das Frischgewicht zeigte das Maximum einen Tag später als das Trockengewicht mit 12,16 g pro Kolben an Tag 8. Anschließend sank auch das Frischgewicht wieder ab.

Dieser Verlauf passt mit dem im Kapitel 3.4.1 beschriebenen Kurvenverlauf zusammen. Sobald der Gehalt an Zucker das Minimum erreicht, können die Zellen nicht mehr wachsen und nehmen nach Tag 7 an Trockengewicht ab. Das Frischgewicht reagiert aufgrund der Wassereinlagerung in den Zellen erst später auf den Mangel an Nährstoffen.

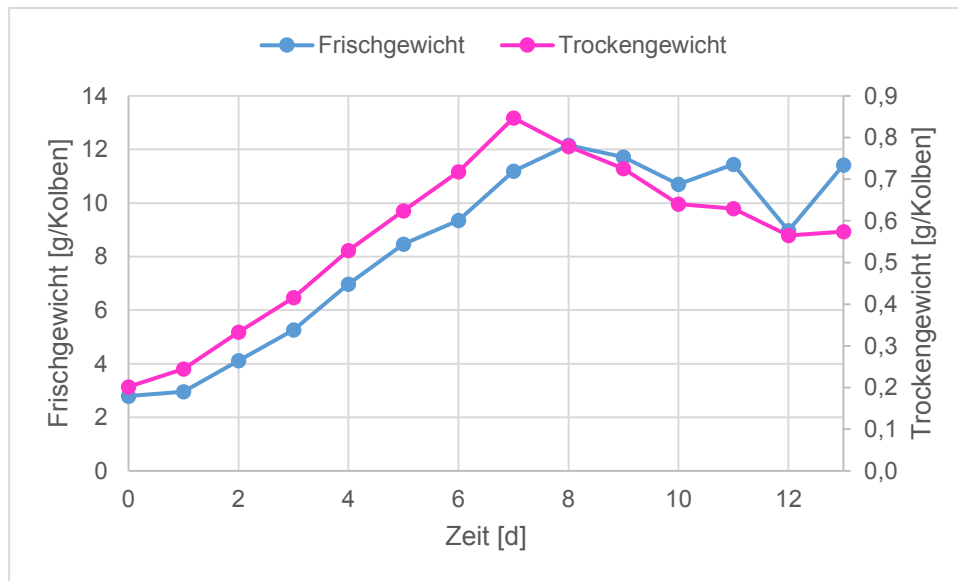


ABBILDUNG 24

Vergleich des Frischgewichts (linke y-Achse) und des Trockengewichts (rechte y-Achse) der Suspensionskultur von *Linum nodiflorum* (Ln1) über einen Zeitraum von 14 Tagen.

3.4.3. Lignangehalt

Ein weiterer Teil der Charakterisierung war die Bestimmung der Menge an Lignan en während des Kulturzeitraums von 14 Tagen.

In Abbildung 25 werden die Ergebnisse für die Endprodukte Podophyllotoxin und 6-Methoxypodophyllotoxin und die Vorstufe Desoxypodophyllotoxin gezeigt. Insgesamt konnten von diesen Lignan en nur geringe Mengen festgestellt werden. Hinsichtlich des Podophyllotoxins konnte die Höchstmenge von 0,027% des TG an Tag 1 der Charakterisierung gemessen werden. Ab dem 3. Tag der Untersuchung wurde kein PTOX mehr nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurde an Tag 0 nur 0,005% 6-Methoxypodophyllotoxin gemessen, der Gehalt sank auf eine Konzentration von 0,002% am 6. Tag. Danach wurde ein Anstieg auf 0,013% an Tag 10 beobachtet und anschließend sank die Menge an MPTOX wieder. Die Konzentration von Desoxypodophyllotoxin startete bei 0,043% des TG. Nach einem Abfall der Konzentration wurde das Maximum an Tag 9 mit 0,045% erreicht und an Tag 12 konnte nur eine Menge von 0,014% des TG gemessen werden. Abbildung 26 zeigt den Verlauf des Gehalts an β -Peltatin und Matairesinol während des Untersuchungszeitraums. Die Menge an Matairesinol erreichte ein Maximum an Tag 9 mit 0,26% des TG und sank danach wieder ab. Die Konzentration von β -Peltatin stieg kontinuierlich bis auf etwa 0,49% des TG an Tag 10 an und blieb bis zum Ende ungefähr gleich. Der Wert an Tag 13 müsste erst auf Reproduzierbarkeit getestet werden.

Die Kurven zeigen, dass von der Kultur entweder PTOX oder MPTOX als Endprodukte hergestellt werden, da während die Menge an PTOX abnimmt die Konzentration an MPTOX zunimmt. Der niedrige Gehalt an MPTOX lässt sich auch durch den hohen Gehalt an β -Peltatin in den Zellen erklären. β -Peltatin stellt eine Vorstufe dieses Lignans dar. Die fehlende Umsetzung der Vorstufe zu MPTOX könnte auf eine niedrige Aktivität der entsprechenden Enzyme zurückzuführen sein. Eine Untersuchung der Aktivität der β -Peltatin O-Methyltransferase führte zu keinem auswertbaren Ergebnis.

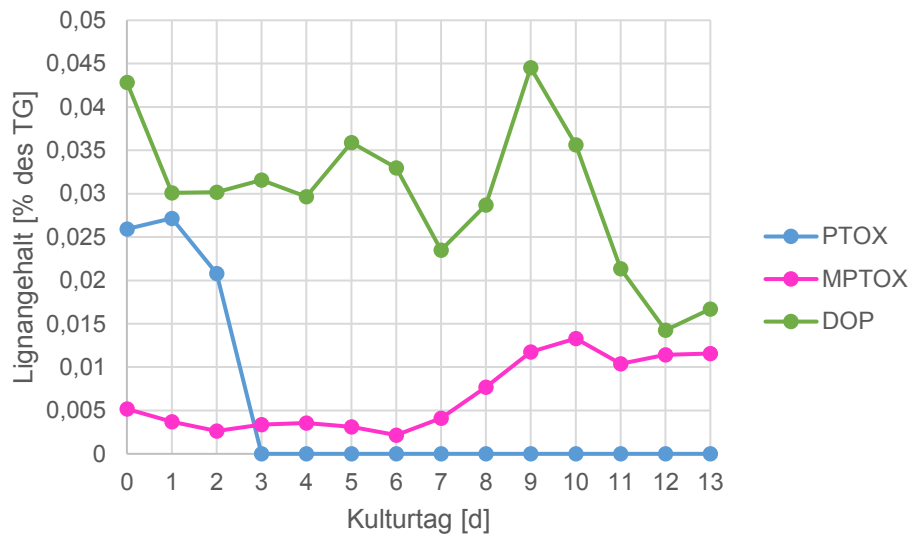
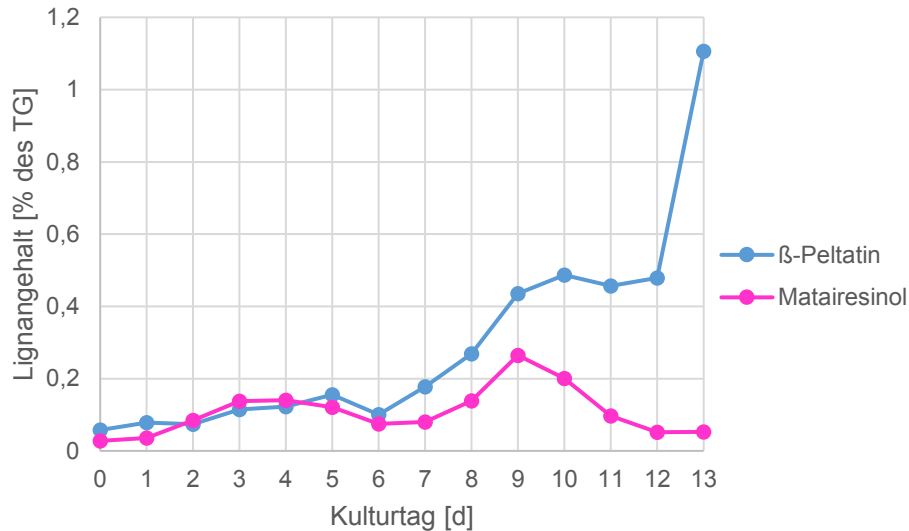


ABBILDUNG 25

Lignangehalte der Suspensionskultur Ln1 über einen Zeitraum von 14 Tagen. Abgebildet sind die Werte für Podophyllotoxin, 6-Methoxypodophyllotoxin und Desoxypodophyllotoxin.

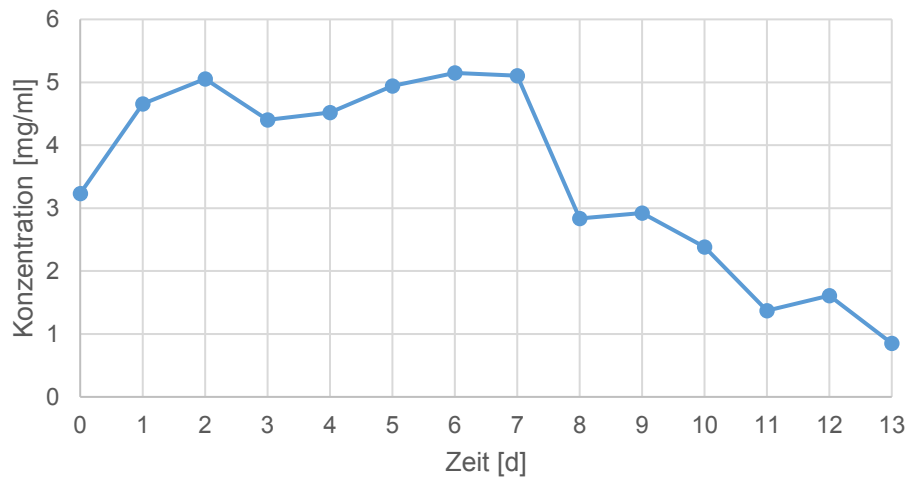
**ABBILDUNG 26**

Lignangehalte der Suspensionskultur Ln1. Verlauf der Menge an den Lignan β -Peltatin und Matairesinol über den Zeitraum von 14 Tagen.

3.4.4. Proteingehalt

Die Überprüfung des Proteingehalts wurde mit einer Bradford-Lösung durchgeführt (Bradford, 1976). Dieser erfasst alle in dem Rohextrakt enthaltenen Proteine.

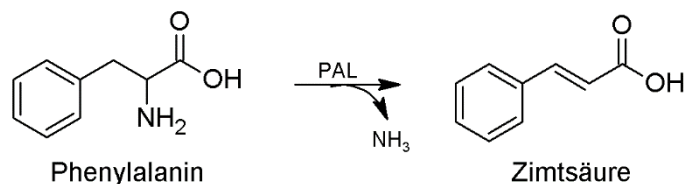
Die Konzentration stieg von 3,23 mg/ml auf etwa 5,05 mg/ml an Tag 3 an (Abbildung 27). Das Maximum wurde an Tag 6 erreicht mit 5,14 mg/ml. Nach dem 7. Tag sank der Proteingehalt wieder und erreichte am letzten Kulturtag der Charakterisierung 0,85 mg/ml. In der Phase des Wachstums wird eine höhere Menge an Proteinen für den Grundstoffwechsel benötigt. Mit dem Beginn der Abnahme der Zellmenge und der geringeren Verfügbarkeit von notwendigen Nährstoffen, nimmt auch der Proteingehalt ab.

**ABBILDUNG 27**

Verlauf des Proteingehalts in Zellrohextrakten während der Kulturcharakterisierung.

3.4.5. PAL-Aktivität

Die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) katalysiert die Reaktion von Phenylalanin zu Zimtsäure. Die Reaktion wird in Abbildung 28 gezeigt. Dieser Schritt spielt eine wichtige Rolle in der Produktion von Coniferylalkohol, welches unter anderem Ausgangsstoff für die Produktion von Lignanen ist.

**ABBILDUNG 28**

Reaktion der Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL)

Der Verlauf der spezifischen Aktivität der PAL zeigte zwei Maxima (Abbildung 29). Ein Maximum wurde am 1. Tag gemessen mit 53,09 $\mu\text{kat/kg}$ und das zweite Maximum an Tag 6 mit 49,69 $\mu\text{kat/kg}$. Anschließend nahm die Aktivität des Enzyms kontinuierlich ab. Dies passt zeitlich zu der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Abnahme des Proteingehalts und dem Absterben der Zellen.

Das Maximum an Tag 1 kann auf die Überführung der Zellen in neues Medium und dem resultierenden „Verdünnungseffekt“ zurückzuführen sein. Dieses Phänomen und der gezeigte

Verlauf wurden schon früher bei Untersuchungen der PAL-Aktivität beobachtet (Hahlbrock und Schröder, 1975; Hahlbrock, 1976; Seidel et al., 2002).

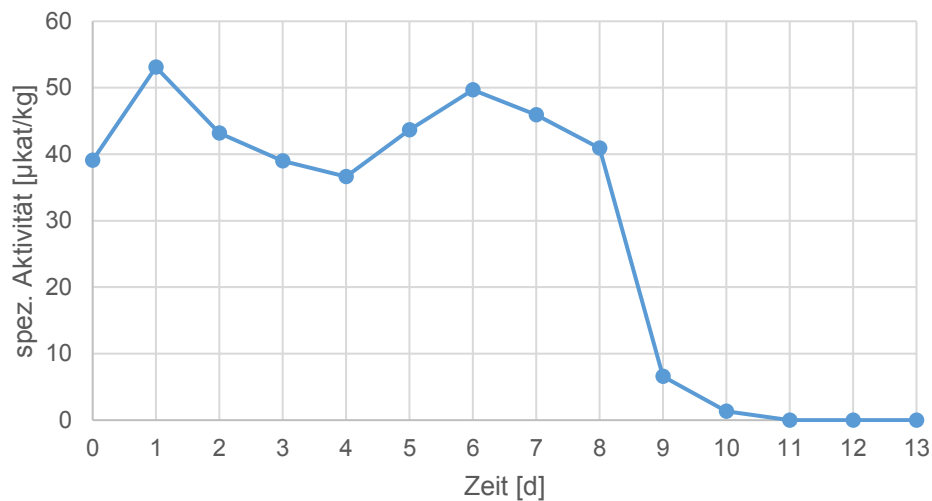


ABBILDUNG 29

Ergebnisse der Bestimmung der Aktivität der Phenylalanin Ammoniak-Lyase in Proteinrohextrakten aus Suspensionszellen von *Linum nodiflorum* über einen Zeitraum von 14 Tagen.

3.4.6. Genexpressionsanalyse verschiedener Methyltransferasen

Die Ermittlung der Genexpression der verschiedenen Methyltransferasen in *Linum nodiflorum* wurde mit Hilfe der qPCR durchgeführt. Die Berechnung der Resultate erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ -Methode. Als Haushaltsgen wurden Actin und der Elongationsfaktor 1-alpha (EF1 α) ausgesucht. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde nur Actin verwendet, da für EF1 α mehrere Peaks in den Schmelzkurven zu sehen waren und dies zeigte, dass mehrere Produkte entstanden sind. Die Ergebnisse wurden in Bezug auf den Tag 0 berechnet.

Unglücklicherweise wurde nach den Versuchen bei der Überprüfung der RNA eine Verunreinigung mit DNA festgestellt. Dies hat vor allem Einfluss auf die späteren Tage bei denen mehr Lösung eingesetzt werden musste, um eine RNA-Menge von 2 µg zu erhalten.

Die relative Expression des Enzyms Ca9OMT hatte ein Maximum an Tag 5, mit einer etwa 200-fach höheren Expression als an Tag 0 (Abbildung 30). Anschließend sank die Expression wieder. Ca9OMT zeigt im Vergleich mit den anderen Methyltransferasen eine sehr viel höhere Expression. Dies könnte auf eine wichtige Aufgabe innerhalb der Pflanze hinweisen. Da die Funktion des Methylethers von Coniferylalkohol noch unbekannt ist, kann in Betracht gezogen werden, dass eventuell Coniferylalkohol nicht das eigentliche Substrat dieses Enzyms ist. Die Resultate für die anderen Methyltransferasen sind in Abbildung 31 zusammengefasst.

Die neu gefundene Methyltransferase LnMT3/LnMT3s zeigte zunächst eine erhöhte Expression an Tag 1 von fast dem Doppelten des 0. Tages. Nachdem die relative Expression sank, stieg sie an Tag 5 auf ein Maximum von über dem 2,5-fachen des Tags 0. An Tag 6 erfolgte eine rasche Abnahme, bevor sie erneut leicht anstieg. Anschließend sank die Expression wieder unterhalb des Wertes von Tag 0. Im Gegensatz dazu hatte die Kaffeesäure O-Methyltransferase LnCOMT ihre maximale Expression an Tag 7. Hier war der Wert etwa 2,5-mal größer als der Ausgangswert an Tag 0. Nach Erreichen des Maximums sank die Expression am 8. Tag auf das Level des Anfangs bzw. danach unterhalb des Ausgangswerts von 1. Das Absinken der Expression lässt sich wieder mit dem Mangel an Nährstoffen und dem Absterben der Zellen erklären. Die Methyltransferase LnCOMT kann zu einem gewissen Maß Kaffeesäure umsetzen, die u.a. an der Synthese des Monolignols Sinapylalkohol, z.B. für die Ligninbiosynthese, beteiligt ist (Zhong, 1998; Dixon et al., 2001). Der Verlauf der Expression von LnCOMT passt zu dem Verlauf der Kurve der PAL-Aktivität, die Zimtsäure als eine Vorstufe von Kaffeesäure produziert. Hinsichtlich der Methyltransferase LnMT3 ist die genaue Funktion unbekannt.

Diese Ergebnisse geben einen ersten Einblick in die Expression der verschiedenen Methyltransferasen. Aber da ein größerer Einfluss der kontaminierenden DNA auf die Resultate nicht ausgeschlossen werden kann, müssen diese durch weitere Tests verifiziert werden.

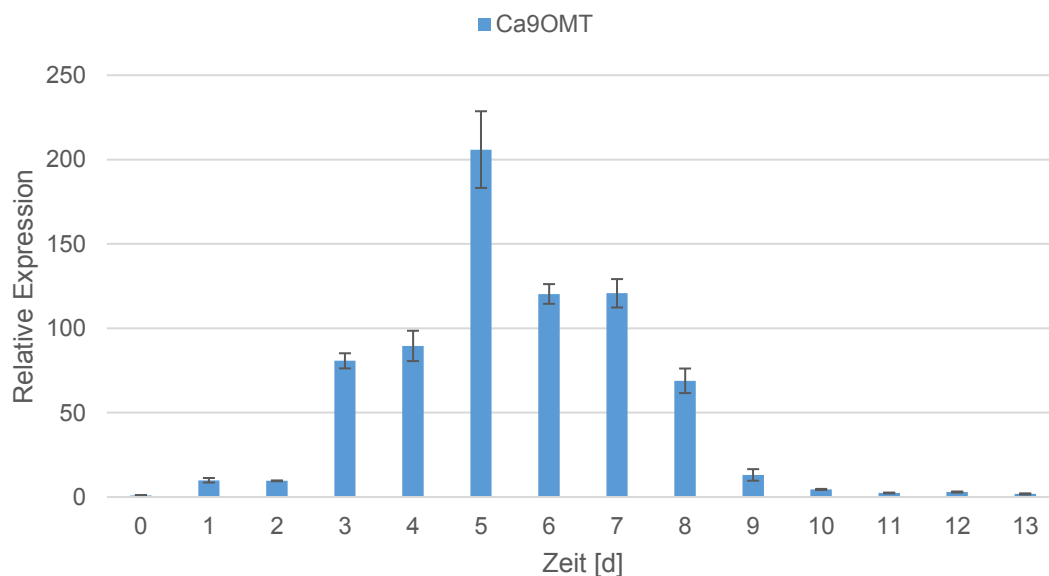
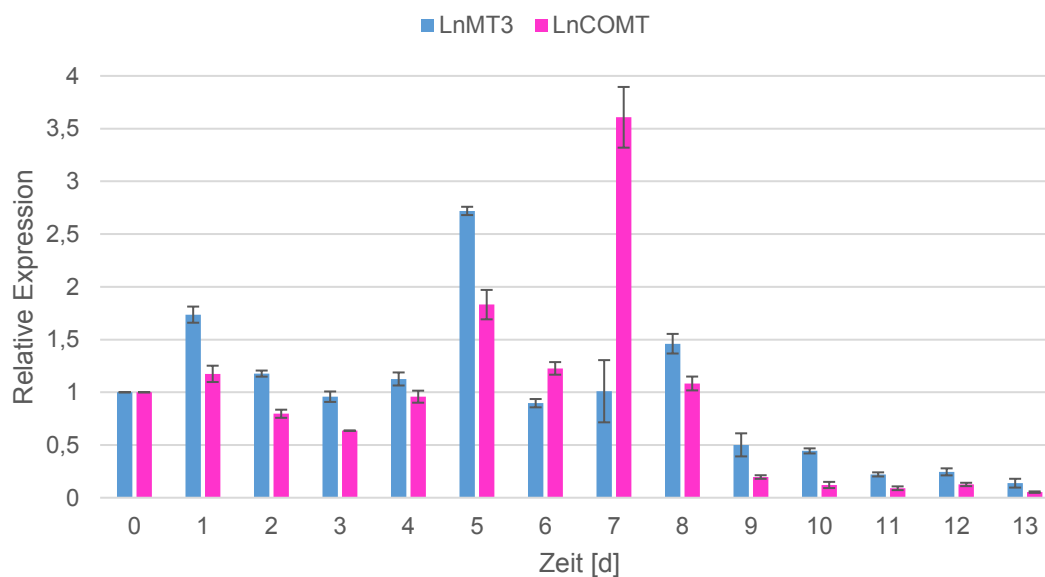


ABBILDUNG 30

Bestimmung der relativen Genexpression der Methyltransferase Ca9OMT in Suspensionszellen von *Linum nodiflorum* (Ln1) während der Kulturcharakterisierung.

**ABBILDUNG 31**

Ergebnisse der Ermittlung der relativen Genexpression der Methyltransferasen LnMT3/LnMT3s und der Kaffeesäure O-Methyltransferase (LnCOMT) in Suspensionszellen von *Linum nodiflorum* (Ln1) im Laufe einer Kulturperiode.

3.5. CYTOCHROM-P450-ENZYME

Die Reaktion von Matairesinol zu Pluviatolid wurde erstmals in *Podophyllum*-Arten gefunden (Marques et al., 2013). Dieser Schritt wird als Teil der Biosynthese beschrieben, bei der Epipodophyllotoxin als Endprodukt entsteht. Katalysiert wird die Reaktion von CYP719A23/24 (s.0).

Um nachzuweisen, dass CYP-Enzyme auch in *Linum*-Arten den Methylenedioxy-Ring bilden, wurde eine Mikrosomenpräparation durchgeführt. Es wurden verschiedene Bedingungen ausprobiert, u.a. Änderung des Erntetags der Zellen, Inkubationszeit und unterschiedliche *Linum*-Arten. Mit Matairesinol konnte hierbei keine Aktivität beobachtet werden.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der isolierten Mikrosomen, wurden gleichzeitig zusätzliche Tests mit Zimtsäure durchgeführt. Zimtsäure wird dabei von der Zimtsäure 4-Hydroxylase, einem CYP-Enzym, zu 4-Cumarsäure umgesetzt. Da diese Kontrolle zu einem positiven Ergebnis führte, kann man davon ausgehen, dass die Mikrosomenpräparation erfolgreich war.

Als weitere Möglichkeit wurde versucht, mit molekularbiologischen Methoden diese Enzyme nachzuweisen. Dazu wurden aus den bekannten Sequenzen der CYP-Enzyme Primer

(degenerierte und CODEHOP-Primer) hergestellt, die für die PCR benutzt wurden. Bei diesem Versuch konnte auch kein positives Ergebnis erreicht werden.

Es ist fraglich, ob dieser Schritt in dieser Form in *Linum*-Arten stattfindet oder eventuell von anderen Enzymen durchgeführt wird. Um dies aufzuklären, sind weitere Untersuchungen notwendig.

3.6. CONIFERYLALKOHOL 9-O-METHYLTRANSFERASE

Die Coniferylalkohol 9-O-Methyltransferase (Ca9OMT) konnte erstmals von Berim et al. (2007) in verschiedenen *Linum*-Arten, u.a. *Linum nodiflorum*, beschrieben werden. Dieses Enzym katalysiert die S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Methylierung von Coniferylalkohol zu Coniferylalkohol 9-O-Methylether (Abbildung 32) und hat eine Größe von etwa 41 kDa. Die Methylierung erfolgt hierbei nicht an der phenolischen, sondern an der aliphatischen Hydroxylgruppe.

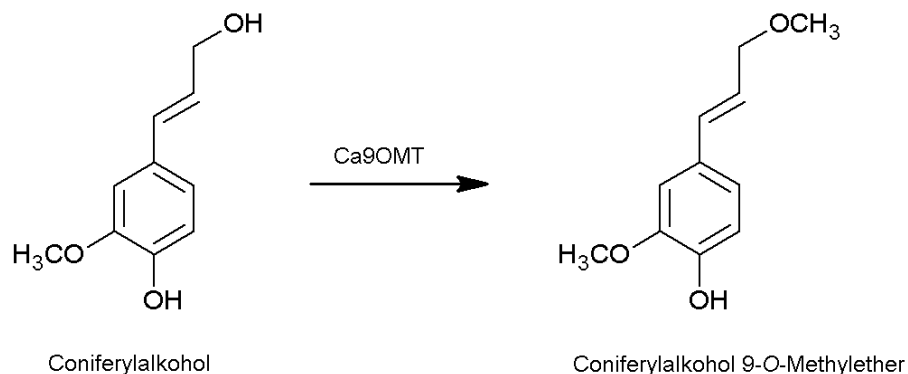
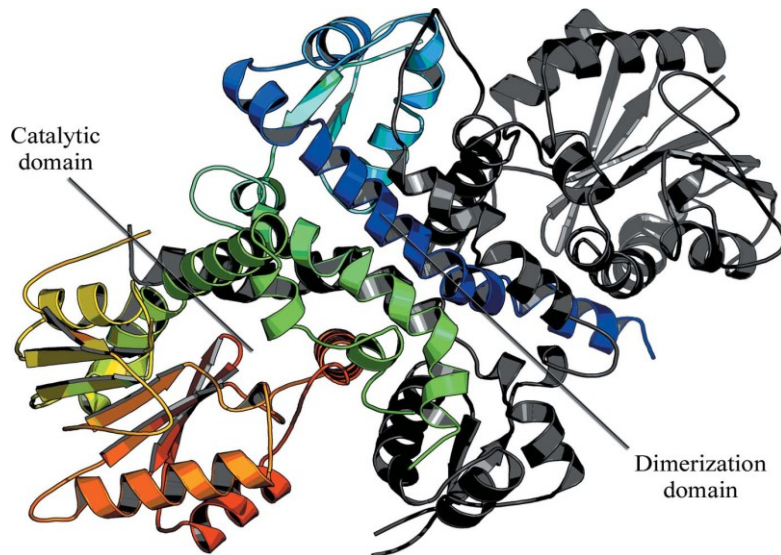


ABBILDUNG 32

Reaktion der Methyltransferase Ca9OMT.

Die Struktur des Enzyms und der mögliche Reaktionsmechanismus wurden von Wolters et al. (2013) beschrieben. Bei dem Enzym Ca9OMT handelt es sich um ein Homodimer. Jedes Monomer besitzt eine Dimerisierungsdomäne am N-Terminus und eine katalytische Domäne am C-Terminus (Abbildung 33). Die Besonderheit des Enzyms ist das Fehlen des Histidin-Rests, welcher in anderen bekannten Methyltransferasen das katalytische Zentrum darstellt. An dieser Stelle befindet sich bei der Ca9OMT ein Cystein-Rest (Cys²⁷¹).

**ABBILDUNG 33**

Struktur des Homodimers Ca9OMT. Monomer A bunt dargestellt mit dem N-Terminus in Blau und dem C-Terminus in Rot (aus Wolters et al., 2013).

In Bezug auf die Reihenfolge der Bindung der Substrate zeigte sich, dass zuerst Coniferylalkohol bindet und dann SAM. Mit der Bindung von SAM ändert sich die Konformation des Enzyms, wobei die Änderung notwendig für den Ablauf der Reaktion ist. Der beschriebene Reaktionsmechanismus beginnt mit der Bindung von Coniferylalkohol mit der 9-OH-Gruppe in Richtung des Aspartats an Position 272 (siehe Abbildung 34). Mit der Bindung von SAM ändert sich die Konformation und das Tyrosin reicht in Richtung der Bindetasche. So entsteht eine stabile Konformation, die das SAM umgibt und zusätzlich kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen diesem Tyrosin (Tyr¹⁶²), dem Aspartat (Asp²⁷²) und einem H₂O-Molekül. Das Asp²⁷² deprotoniert die 9-OH-Gruppe des Coniferylalkohols und ein nucleophiler Angriff auf die aktivierte Methylgruppe des SAM kann stattfinden. Sobald das Asp²⁷² protoniert ist, wird die Wechselwirkung mit H₂O und Tyr¹⁶² geschwächt und Tyr¹⁶² bewegt sich wieder aus der Bindetasche heraus. So können SAH und der gebildete Coniferylalkohol 9-O-Methylether die Bindetasche verlassen.

Eine Mutagenese des Enzyms wurde ebenfalls von Wolters et al. (2013) durchgeführt. Dabei wurde Cystein (Cys²⁷¹) gegen Alanin bzw. gegen Serin (C271A und C271S) ausgetauscht. Außerdem wurden die Aminosäuren Asparaginsäure (Asp²⁷²) in Asparagin (D272N) und Tyrosin (Tyr¹⁶²) in Phenylalanin (Y162F) geändert.

Für diese Mutanten wurde in dieser Arbeit versucht, die kinetischen Parameter zu bestimmen.

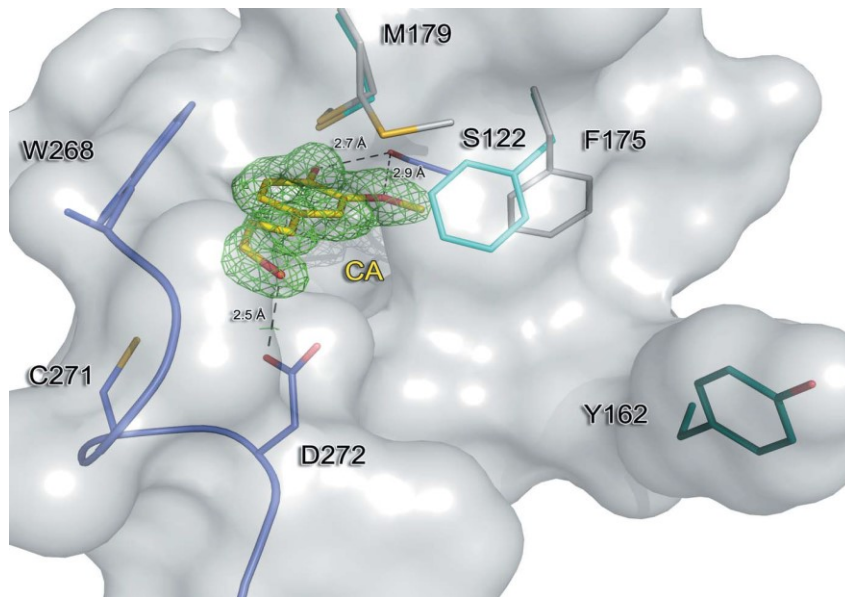


ABBILDUNG 34

Bindung von Coniferylalkohol (Gelb) in der Bindetasche von Ca9OMT (Wolters et al., 2013).

3.6.1. Herstellung des Coniferylalkohol 9-O-Methylether-Standards

Für die Auswertung der Enzymtests der Ca9OMT-Mutanten musste ein Ca9Me-Standard hergestellt werden. Dazu wurden Enzymtests mit dem Ca9OMT-Wildtyp durchgeführt. Die Abbildung 35 zeigt die Resultate dieser Tests. Nach der erfolgreichen Extraktion von Ca9Me wurde die Konzentration der Lösung bestimmt und der Standard konnte für die weiteren Versuche verwendet werden.

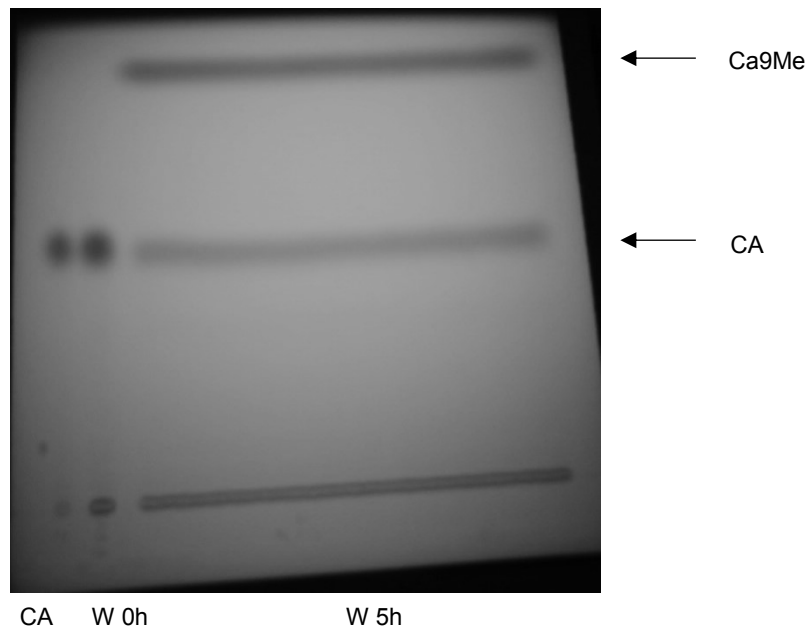


ABBILDUNG 35

Ergebnis der Dünnschichtchromatographie der Inkubationen von Wildtyp-Ca9OMT (W) mit Coniferylalkohol (CA) zur Isolierung von Coniferylalkohol 9-O-Methylether.

W 0h: Test nach 0 h Inkubation

W 5h: Test nach 5 h Inkubation

3.6.2. Ca9OMT-Mutante C271A

Bei dieser Mutante wurde die polare Aminosäure Cystein gegen das unpolare Alanin ausgetauscht.

Die Abbildung 36 zeigt die SDS-PAGE des heterolog exprimierten und über His-Tag aufgereinigten Proteins. Darauf waren nach erfolgreicher Aufreinigung eindeutige Banden der richtigen Größe in den Elutionsfraktionen zu erkennen.

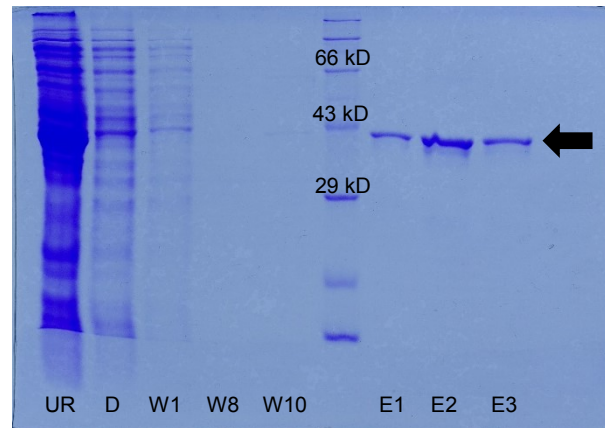


ABBILDUNG 36

SDS-Page der heterolog exprimierten C271A-Mutante bei Aufreinigung durch Metallchelate-Chromatographie

UR: Unlöslicher Rückstand; D: Durchfluss; W1: Waschfraktion 1; W8: Waschfraktion 8; W10: Waschfraktion 10;
E1-3: Elutionsfraktionen 1-3

Zur Ermittlung des K_m -Werts für Coniferylalkohol wurden zuerst die Proteinmenge und die Inkubationszeit für optimale Reaktionsbedingungen bestimmt. Daraufhin wurden 20 μg Protein eingesetzt und eine Inkubationszeit von 5 min gewählt. Das erhaltene Diagramm mit Variation der Coniferylalkoholkonzentration wird in Abbildung 37 gezeigt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse nach Lineweaver-Burk bzw. Hanes-Woolf aufgetragen (Abbildung 38). Die berechneten Werte werden in Tabelle 3 gezeigt. Hierbei wurden neben der Berechnung des K_m -Wertes mittels nichtlinearer Regression auch die Berechnungen nach den Linearisierungsverfahren (lineare Regression) durchgeführt. Die Abweichungen der berechneten Werte sind hierbei vermutlich auf den erneuten Anstieg der Umsatzgeschwindigkeit bei einer Substratkonzentration von 500 μM zurückzuführen. Zur besseren Vergleichbarkeit werden die Werte unter Abschnitt 3.6.3 zusammen mit C271S besprochen.

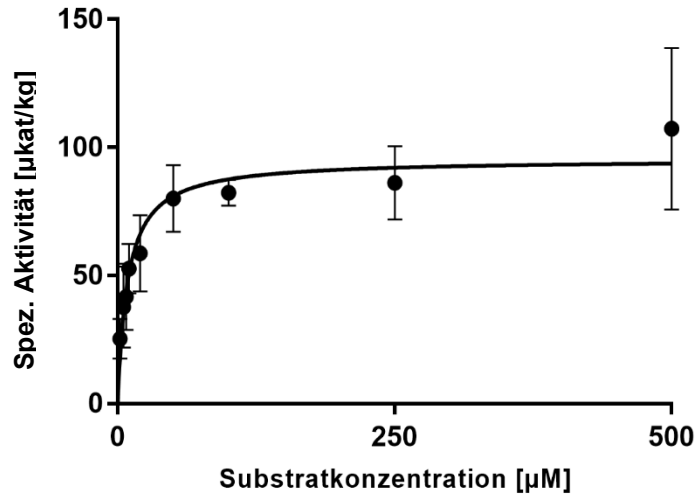


ABBILDUNG 37

Direkte Auftragung der spezifischen Aktivität der Ca9OMT-Mutante C271A gegen die Konzentration an Coniferylalkohol.

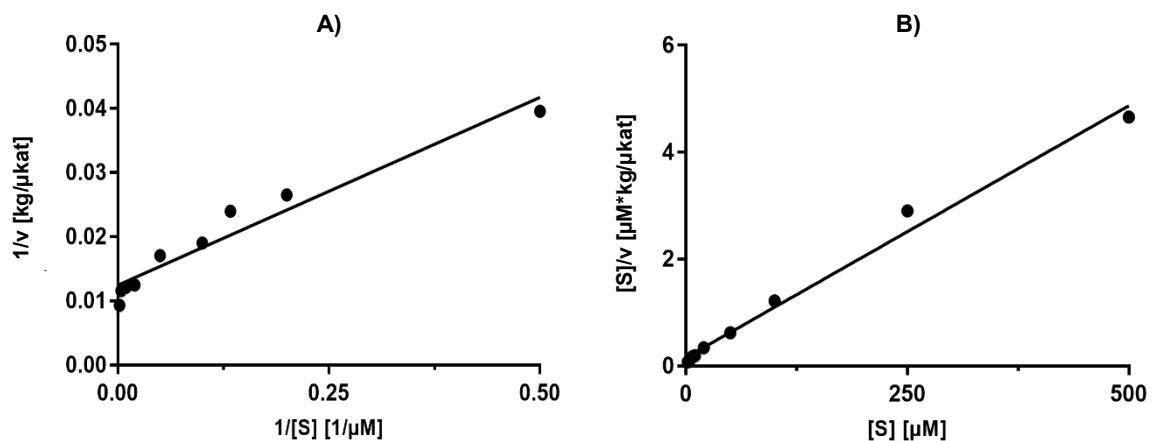


ABBILDUNG 38

A) Lineweaver-Burk-Diagramm der Daten aus Abb. 37

B) Hanes-Woolf-Diagramm der Daten aus Abb. 37

Beide Diagramme zeigen die Auswertung der Tests von C271A mit dem Substrat Coniferylalkohol.

TABELLE 3

Kinetische Parameter von C271A mit dem Substrat Coniferylalkohol (CA). Der K_m -Wert und v_{max} wurde mit Hilfe der nichtlinearen Regression berechnet. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse zusätzlich nach linearer Regression (Lineweaver-Burk bzw. Hanes-Woolf) berechnet ($n=4$).

Enzym	K_m CA [μ M]	K_m CA [μ M] nach Lineweaver- Burk	K_m CA [μ M] nach Hanes- Woolf	v_{max} [μ kat/kg]	Katalytische Effizienz [v_{max}/K_m]
C271A	8,91	4,72	16,76	95,37	10,70

3.6.3. Ca9OMT-Mutante C271S

Die Mutante C271S besitzt an der Position 271 statt des Cysteins die Aminosäure Serin. Bei beiden handelt es sich um polare Aminosäuren.

Die Abbildung 39 zeigt das Ergebnis einer SDS-PAGE nach erfolgreicher Aufreinigung. Die Banden in den Elutionsfraktionen waren deutlich zu erkennen und entsprachen der gewünschten Größe.

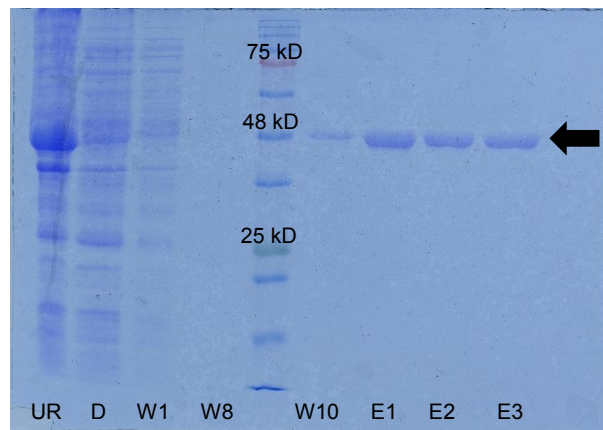


ABBILDUNG 39

SDS-PAGE der heterolog exprimierten C271S-Mutante bei Aufreinigung durch Metallchelate-Chromatographie

UR: Unlöslicher Rückstand; D: Durchfluss; W1: Waschfraktion 1; W8: Waschfraktion 8; W10: Waschfraktion 10; E1-3: Elutionsfraktionen 1-3

Die Bestimmung des K_m -Werts wurde auch mit einer Proteinmenge von 20 μg und einer Inkubationszeit von 5 min durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse wird in den Abbildung 40 und Abbildung 41 gezeigt. Bei den Graphen handelt es sich zum einen um die direkte Auftragung der Werte und zum anderen um die linearisierten Darstellungen. Mittels Hanes-Woolf war es nicht gelungen bei Berücksichtigung aller Substratkonzentrationen einen entsprechenden K_m -Wert zu berechnen (Tabelle 4). Dieses Problem lässt sich durch die sinkende Umsatzgeschwindigkeit bei einer Substratkonzentration von 500 μM erklären, was auf eine Substrathemmung hinweist. Ohne diesen Wert ließ sich ein Wert von 3,01 μM berechnen.

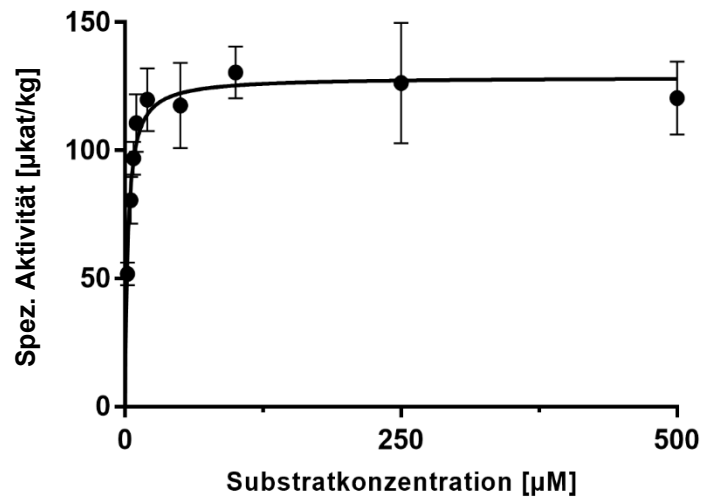


ABBILDUNG 40

Direkte Auftragung der spezifischen Aktivität der Ca9OMT-Mutante C271S gegen die Konzentration an Coniferylalkohol.

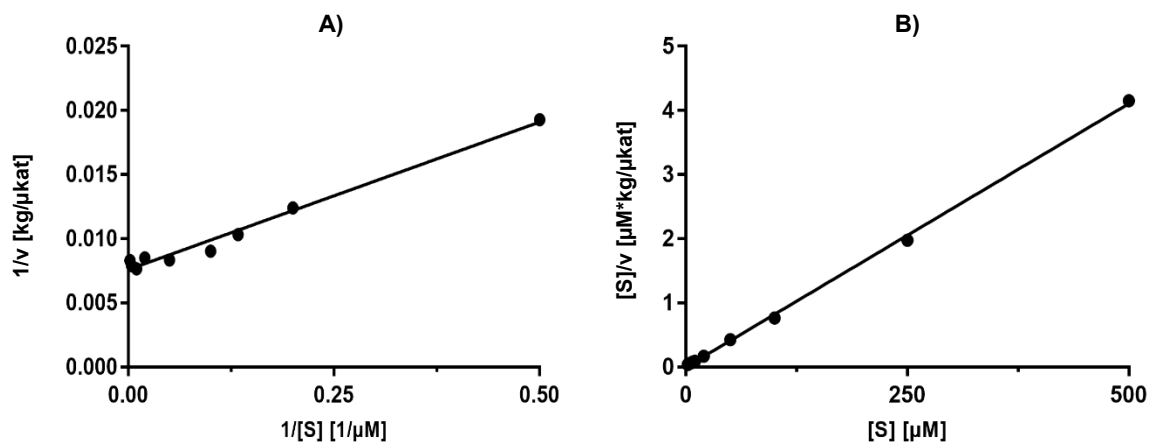


ABBILDUNG 41

A) Lineweaver-Burk-Diagramm der Daten aus Abb. 40

B) Hanes-Woolf-Diagramm der Daten aus Abb. 40

Beide Diagramme zeigen die Ergebnisse für C271S mit dem Substrat Coniferylalkohol.

TABELLE 4

Kinetische Parameter für C271S mit dem Substrat Coniferylalkohol. K_m -Wert und v_{max} wurden nach nichtlinearer Regression bzw. zum Vergleich nach linearer Regression ermittelt ($n=4$).

Enzym	K_m CA [μ M]	K_m CA [μ M] nach Lineweaver- Burk	K_m CA [μ M] nach Hanes- Woolf	v_{max} [μ kat/kg]	Katalytische Effizienz (v_{max}/K_m)
C271S	2,58	2,95	(3,01)	128,6	49,84

Vergleicht man die K_m -Werte der Mutanten C271A und C271S, ist zu erkennen, dass der Wert im Fall von C271S mit etwa 2,58 μM niedriger ist als der von C271A mit näherungsweise 8,91 μM . Da der K_m -Wert ein Maß für die Affinität des Substrats zu einem Enzym ist, sprechen die Ergebnisse für eine höhere Affinität des Coniferylalkohols zu C271S. Die Abbildung 42 zeigt den Vergleich der Kurven der zwei Mutanten und spiegelt dieses Resultat wider. Deutlich ist neben dem niedrigeren K_m -Wert auch die höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Mutante C271S zu bemerken.

Die entsprechenden Parameter des Wildtyps von Ca9OMT liegen bei 7,23 μM und einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 707,5 $\mu\text{kat/kg}$ (Berim et al., 2007). Die Mutante C271S zeigt eine leicht höhere Affinität zu Coniferylalkohol als der Wildtyp, während im Gegensatz dazu C271A eine geringere Affinität als der Wildtyp aufweist. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten für beide Mutanten (C271S: 128,6 $\mu\text{kat/kg}$; C271A: 95,4 $\mu\text{kat/kg}$) sind sehr viel niedriger als die des Ca9OMT-Wildtyps und damit nimmt mit den Mutationen auch die Enzymeffizienz ab.

Die Resultate bestätigen die Annahme von Wolters et al. (2013), dass die Aminosäure Cystein keine entscheidende Rolle bei der Aktivität des Enzyms Ca9OMT spielt. Dennoch scheint der Austausch gegen das unpolare Alanin einen größeren Einfluss auf die Effizienz des Enzyms zu haben.

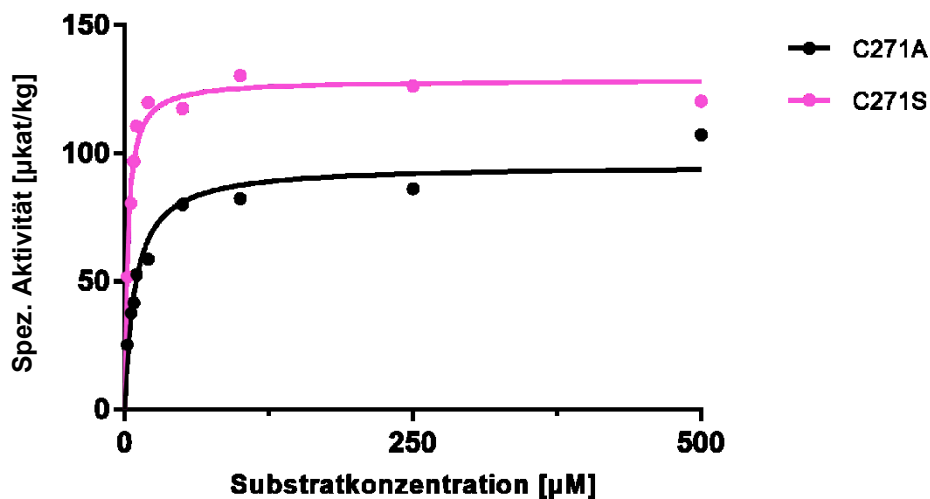


ABBILDUNG 42

Vergleich der Substrat-Sättigungs-Kurven für das Substrat Coniferylalkohol der Mutanten C271A und C271S.

Hinsichtlich der kinetischen Parameter für das Substrat SAM wurden diese nur für die Mutante C271S bestimmt. Für die Bestimmung der Parameter für SAM wurde nach entsprechenden Tests 20 μg Enzym eingesetzt und eine Inkubationszeit von 15 min gewählt. Die Ergebnisse

sind in der direkten Auftragung und der linearisierten Form in Abbildung 43 und Abbildung 44 dargestellt. Die dazugehörigen Werte sind in der Tabelle 5 angegeben.

Bei der Betrachtung der linearisierten Auftragungen (Abbildung 44) fällt auf, dass die Punkte keine Gerade bilden. Dies führt auch zu Abweichungen bei den verschiedenen Berechnungen der K_m -Werte. Der pseudohyperbole Verlauf der Graphen erinnert an eine negative Kooperativität. Wolters et al. (2013) konnte allerdings nachweisen, dass bei dem Ca9OMT-Wildtyp die Bindung von SAM verbessert wird, sobald Coniferylalkohol zuerst gebunden wird. Auch wurde keine negative Kooperativität bei dem Wildtyp des Enzyms festgestellt. Es bedarf weiterer Untersuchungen des Bindungsmechanismus, um festzustellen, ob der Austausch der Aminosäuren zum Auftreten des Effekts führen kann.

Der K_m -Wert der C271S-Mutante für SAM lag näherungsweise bei 85,31 μM und v_{max} betrug 359,5 $\mu\text{kat/kg}$. Die kinetischen Parameter des Wildtyps wurden von Berim et al. (2007) bestimmt. Der K_m -Wert für SAM lag bei etwa 18,54 μM und v_{max} lag bei 690,99 $\mu\text{kat/kg}$. Vergleicht man diese Werte, zeigt sich, dass die Affinität des Enzyms zu SAM mit dem Austausch des Cysteins durch Serin deutlich abnimmt. Dies steht im Gegensatz zu der verbesserten Affinität für das Substrat Coniferylalkohol.

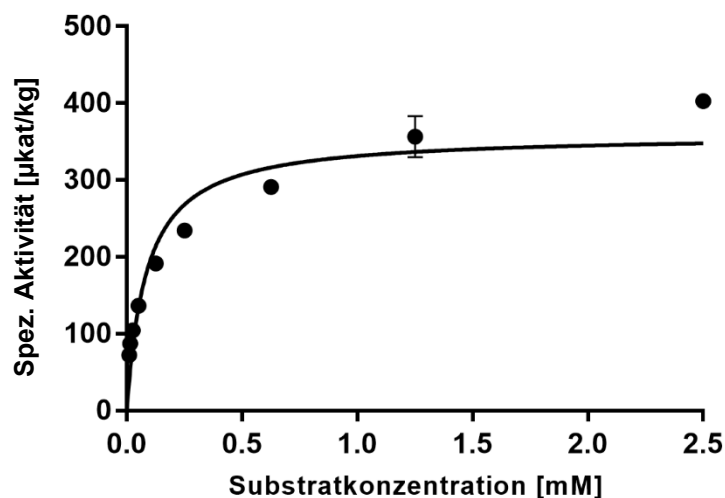


ABBILDUNG 43

Direkte Auftragung der spezifischen Aktivität der Ca9OMT-Mutante C271S gegen die Konzentration an SAM.

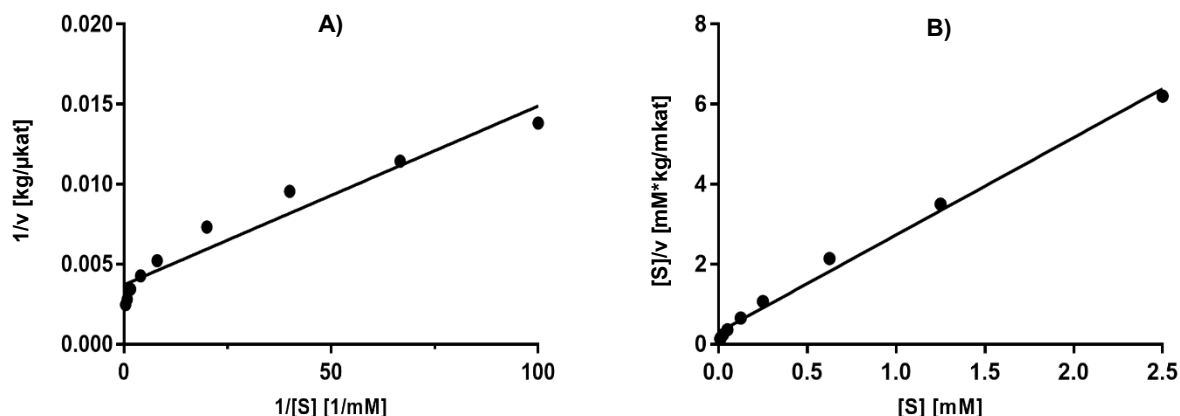


ABBILDUNG 44

A) Lineweaver-Burk-Diagramm der Werte aus Abb. 43

B) Hanes-Woolf-Diagramm der Werte aus Abb. 43

Beide Diagramme bilden die Ergebnisse von C271S mit dem Substrat SAM ab.

TABELLE 5

Kinetische Parameter für C271S mit dem Substrat SAM. K_m -Wert und v_{max} wurden nach nichtlinearer Regression bzw. zum Vergleich nach linearer Regression (K_m -Werte) ermittelt ($n=4$).

Enzym	K_m SAM [μ M]	K_m SAM [μ M] nach Lineweaver-Burk	K_m SAM [μ M] nach Hanes-Woolf	v_{max} [μ kat/kg]
C271S	85,31	30,19	124,46	359,5

3.6.4. Ca9OMT-Mutante D272N

Bei der Methyltransferase D272N wurde eine Mutagenese an der Position 272 durchgeführt. Hierbei wurde die saure Aminosäure Asparaginsäure in die neutrale Aminosäure Asparagin verändert. Ebenso wie die vorherigen Mutanten konnte diese erfolgreich aufgereinigt werden. Die gewünschten Banden sind in den Elutionsfraktionen der SDS-PAGE in der Abbildung 45 zu sehen. Mit dem erhaltenen Enzym wurden die Enzymtests ausgeführt.

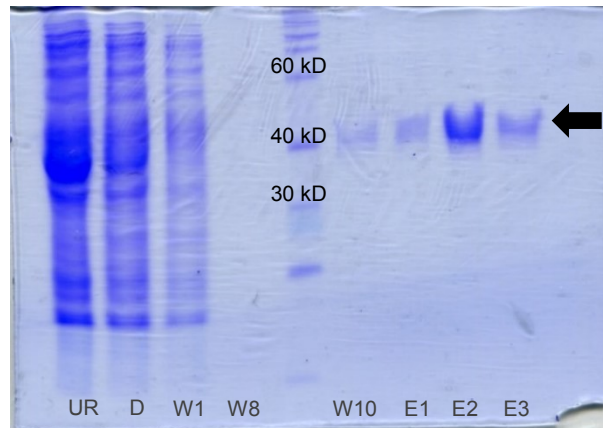


ABBILDUNG 45

SDS-PAGE der heterolog exprimierten D272N-Mutante bei Aufreinigung durch Metallchelate-Chromatographie

UR: Unlöslicher Rückstand; D: Durchfluss; W1: Waschfraktion 1; W8: Waschfraktion 8; W10: Waschfraktion 10; E1-3: Elutionsfraktionen 1-3

Die Ergebnisse der Enzymtests werden in den unten gezeigten Chromatogrammen (Abbildung 46 und Abbildung 47) dargestellt. Zuerst wurde eine Proteinmenge von 200 µg eingesetzt, um eine Aktivität des Enzyms festzustellen. Dabei wurde nach 60 min keine Umsetzung des Coniferylalkohols beobachtet. Zur genaueren Beurteilung der Aktivität von D272N wurde die Proteinmenge erhöht und eine Inkubationszeit von 24 h ausprobiert. Hier konnte ebenfalls keine Bildung von Ca9Me ermittelt werden. Der zusätzliche Peak, der in dem Chromatogramm zu finden ist, konnte nicht identifiziert werden.

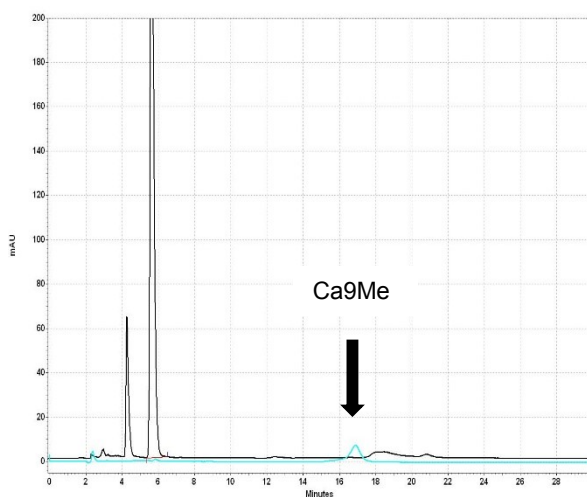


ABBILDUNG 46

Enzymtest mit 200 µg Enzym und einer Inkubationszeit von 60 min. Zum Vergleich ist der Standard des Ca9Me in Blau abgebildet.

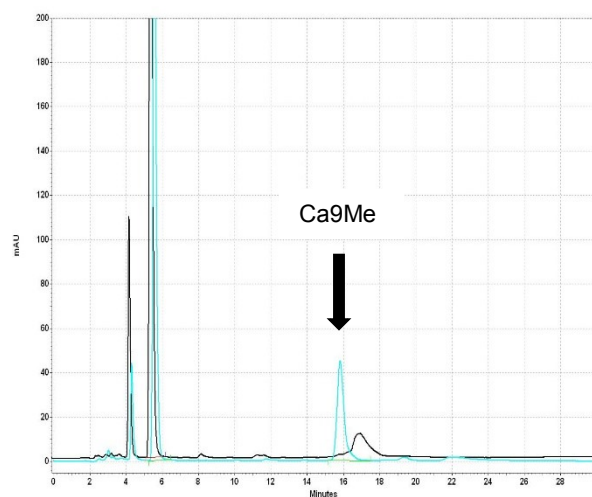


ABBILDUNG 47

Enzymtest mit 400 µg Enzym nach einer Inkubationszeit von 24 h. Zum Vergleich mit einem Test des Wildtyps abgebildet (blau).

Der von Wolters et al. (2013) beschriebene Reaktionsmechanismus geht davon aus, dass das Aspartat als Akzeptor für das Proton der 9-OH-Gruppe fungiert. Durch den Austausch der Aminosäure gegen Asparagin geht diese Funktion verloren und damit auch die Möglichkeit des nucleophilen Angriffs auf SAM. Die hier gezeigten Resultate bestätigen dies.

3.6.5. Ca9OMT-Mutante Y162F

Y162F besitzt eine Mutation an der Position 162. Hier wurde Tyrosin gegen Phenylalanin gewechselt. Die Aufreinigung des Enzyms wurde erfolgreich durchgeführt. Die Ergebnisse sind unten abgebildet (Abbildung 48). In dem Bild sind deutliche Banden im gewünschten Bereich in den Elutionsfraktionen zu erkennen.

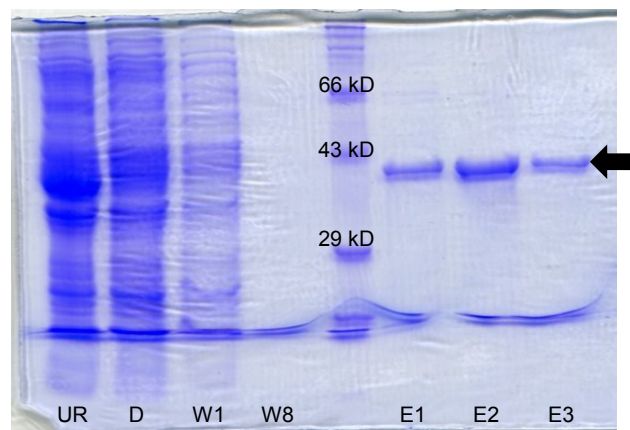


ABBILDUNG 48

SDS-PAGE der heterolog exprimierten Y162F-Mutante bei Aufreinigung durch Metallchelate-Chromatographie

UR: Unlöslicher Rückstand; D: Durchfluss; W1: Waschfraktion 1; W8: Waschfraktion 8; E1-3: Elutionsfraktionen 1-3

Das Enzym wurde mehrfach seine Aktivität getestet. In Abbildung 49 ist ein Chromatogramm des Tests mit 300 µg Protein und nach verschiedenen Inkubationszeiten dargestellt.

Bei Y162F wurde im Gegensatz zu der Mutante D272N eine niedrige Umsetzung von Coniferylalkohol zu dem Methylether beobachtet. Eine Ermittlung der kinetischen Parameter dieser Mutante war aber aufgrund der geringen Aktivität nicht möglich.

In Bezug auf den Reaktionsmechanismus nimmt man an, dass das Tyrosin mit dem Aspartat an Position 272 eine Wechselwirkung eingeht und für eine stabile Konformation nach der SAM-Bindung sorgt. Durch die Änderung zu der Aminosäure Phenylalanin wird die Interaktion mit dem Aspartat gestört und ein fester Halt der Substrate wird verhindert (Wolters et al. 2013).

Diese Resultate bestätigen ebenfalls diese Annahme. Das Stören dieser Wechselwirkungen führt zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität.

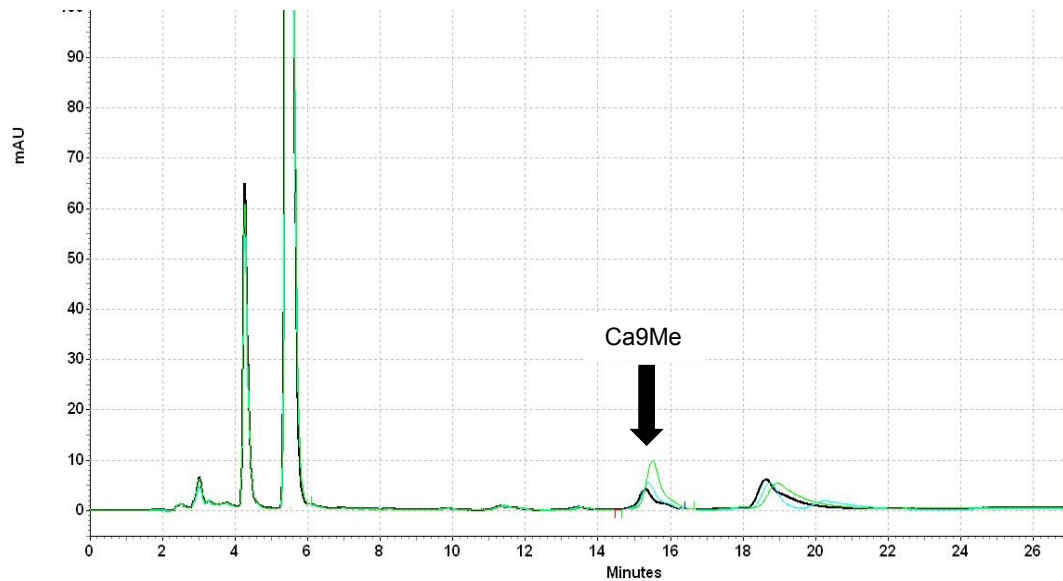


ABBILDUNG 49

Chromatogramme der Enzymtests von Y162F (300 µg) mit Coniferylalkohol nach verschiedenen Inkubationszeiten (Inkubationszeit: 30 min (schwarz), 60 min (blau) und 120 min (grün)).

3.7. KAFFEESÄURE O-METHYLTRANSFERASE

3.7.1. Kaffeesäure O-Methyltransferase aus *Linum nodiflorum*

Die Sequenz der Methyltransferase (LnCOMT) war zu Beginn dieser Arbeit schon bekannt und im Expressionsvektor pRSET C und Expressionsstamm SoluBL21 vorhanden (Stefan Wolters, unveröffentlicht).

Nukleotidsequenz von LnCOMT:

```
ATGGGCTCAGCACCGGAAACCCAGATGACCCCAACCGTGGTCTCCGACGAGGAAGCCAACCTATTCGCTAT
GCAGCTAGCCAGCGCCTCCGTCCTACCCATGGTCCTCAAATCCGCCCTCGAGCTCGACCTCCTTGAAATCAT
CTCCAAGGCCGCGCCCGGCGCTTACCTTTCCCTTCCGACATCGCCGCCAGCTCCCCACCAAGAACCCAG
AAGCCCCCGACATGCTCGACCGCATCTGCCGCCTCCTCGCTTCTACTCCGTCCTCACTGCTCCGTCCAAA
CCCTCCCAAACGGCGCCGTCCAGCGGCTCTACGGCGCCGCCCTGTCTGCAAGTTCCTCACCAAGAACGAG
GACGGCGTCTCCATCGCCGCCCTTGCTCTCATGAACCAGGACAAGGTCCTAATGGAGAGCTGGTATCATTG
AAAGATGCGGTGTTGGATGGAGGGATCCCGTTCAACAAGGCGTATGGGATGACGGCGTTTCAGTACCACGG
CACCGATCCGAGATTCAACAAGGTGTTCAACAAGGGGATGTCTGATCACTCCACCATTACGATGAAGAAGCT
CTTGAGAGCTACACGGGATTCGACGGCCTGGAATCGCTGGTGGGTGTCGGCGGCGGAACTGGTGCTGTA
CTCAGCATGATCCTGTGCAAGCATCCTTCGATTAAGGGGATTAATTCGATCTCCCTCATGTTATCGCCGATG
CCCCGCCTCTCCCTGGCGTCAAGCACGTTGGCGGCGACATGTTGCCTCCGTCCTTCCGGCGACGCCATT
TTCATGAAGTGGATATGTCACGATTGGAGCGACGAGCACTGCTTGAAGTTCCTGAAGAACTGCTACGAGGCG
CTGCCGGCGAAGGGGAAAGTGATAGTGTGCGAGTGCATACTGCCGGTGGCGCCGGACGCGAGCCTGGCGA
```

CGAAGAACGTGGTACACATAGACTGCATCATGTTGGCGCACAAACCCAGGAGGGAAAGAGAGGACACAGTCG
GAGTTCGAGTCGCTGGCAAAGGGCGCCGGCTTCAAGGGCTTCAAGGTTCTCTGCTCTGCTTTCAACACCTAT
GTCATGGAGTTCCTCAAAACTGCCGCCTGA

Aminosäuresequenz von LnCOMT:

MGSAPETQMTPTVVSDDEANLFAMQLASASVLPMLVLSALELDLLEISKAGPGAYLSPSDIA
AQLPTKNPEAPDMLDRICRLASYSVLTCVQTLPNGAVQRLYGAAPVCKFLTKNEDGVSLA
ALALMNQDKVLMESWYHLKDAVLDDGGIPFNKAYGMTAFEYHGTDPFRNKVFNKGMSDHST
ITMKKLLESYTGFDGLESVLGVGGGTGAVLSMILSKHPSIKGINFDLPHVIADAPPLPGVKHV
GGDMFASVPSGDAIFMKWICHDWSDHCLKFLKNCYEALPAKGKVIVCECILPVAPDASLAT
KNVVHIDCIMLAHNPPGGKERTQSEFESLAKGAGFKGFKVLCSAFNTYVMEFLKTAA-

Das Ziel war die Identifikation des Substrats dieses Enzyms. Die Abbildung 50 zeigt das Ergebnis einer SDS-PAGE der gesammelten Proben während der Aufreinigung durch Metallchelate-Chromatographie. Hier waren in den Elutionsfraktionen deutliche Banden zu sehen, die auch mit der Größe des Proteins (~44 kDa) übereinstimmen.

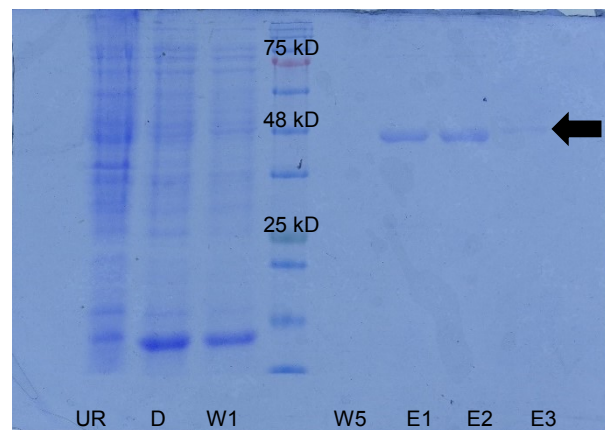


ABBILDUNG 50

SDS-PAGE der heterolog exprimierten LnCOMT bei der Aufreinigung durch Metallchelate-Chromatographie

UR: Unlöslicher Rückstand; D: Durchfluss; W1: Waschfraktion 1; W5: Waschfraktion 5; E1-3: Elutionsfraktionen 1-3

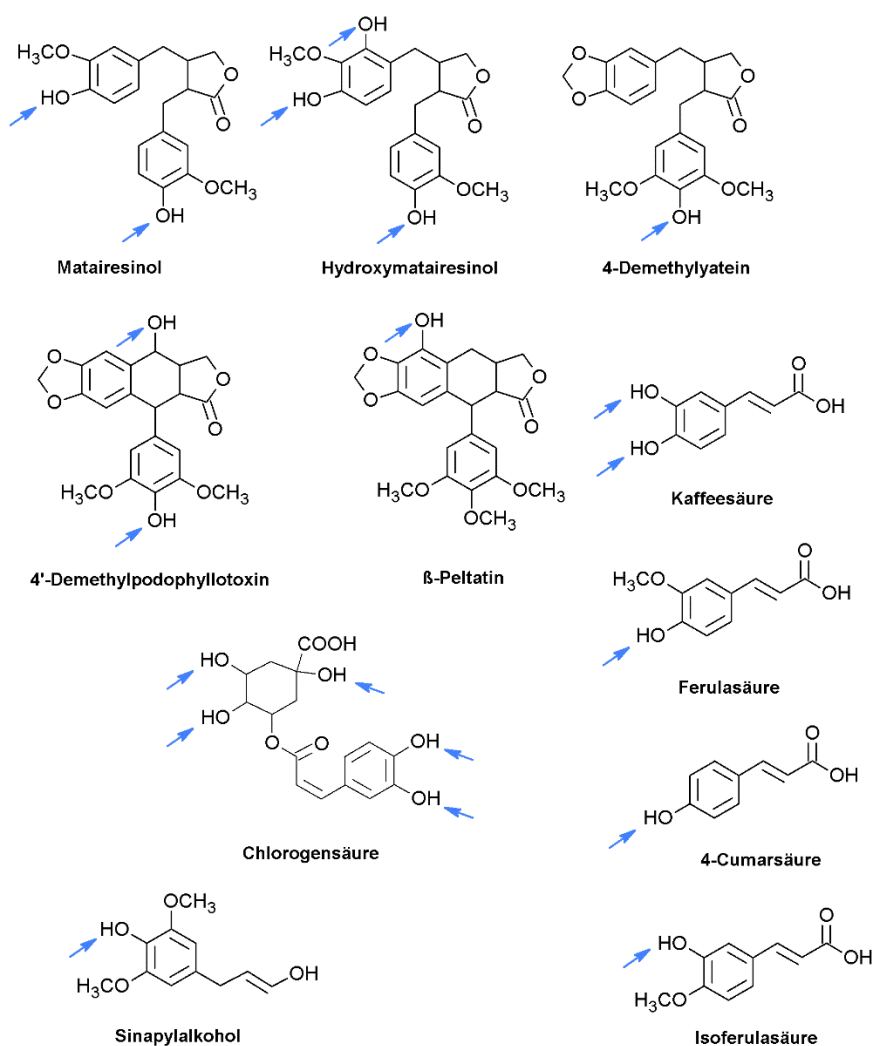


ABBILDUNG 51

Substrate, die mit LnCOMT getestet wurden. Die Pfeile zeigen Hydroxylgruppen, die methyliert werden können.

Nach der erfolgreichen Aufreinigung wurden Enzymtests mit verschiedenen in Frage kommenden Substraten durchgeführt (Abbildung 51). Das einzige dieser Substrate, welches von LnCOMT umgesetzt wurde, war Kaffeesäure. Als Reaktion wurde die Umsetzung zu Ferulasäure angenommen (Abbildung 52).

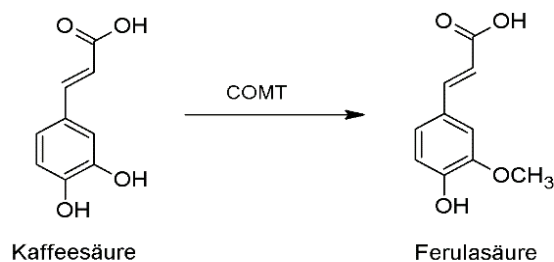


ABBILDUNG 52

Vermutete Reaktion der Methylierung von Kaffeesäure durch LnCOMT.

Weitere Tests mit denaturiertem Protein (10 min, 95°C) wurden durchgeführt, dabei zeigte sich keine Umsetzung der Kaffeesäure und damit konnte eine enzymatisch ablaufende Reaktion bestätigt werden. Um das Endprodukt zu identifizieren, wurden verschiedene Methoden benutzt. Als erstes wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Das Ergebnis wird in Abbildung 53 gezeigt. Neben dem Produkt des Enzymtests wurden zum einen Kaffeesäure und Ferulasäure, zum anderen Mischungen des Enzymtests mit den entsprechenden Standards aufgetragen. Dies diente zur besseren Identifizierung des Produkts. Auf der DC-Platte war zu erkennen, dass aus Kaffeesäure Ferulasäure entstanden war.

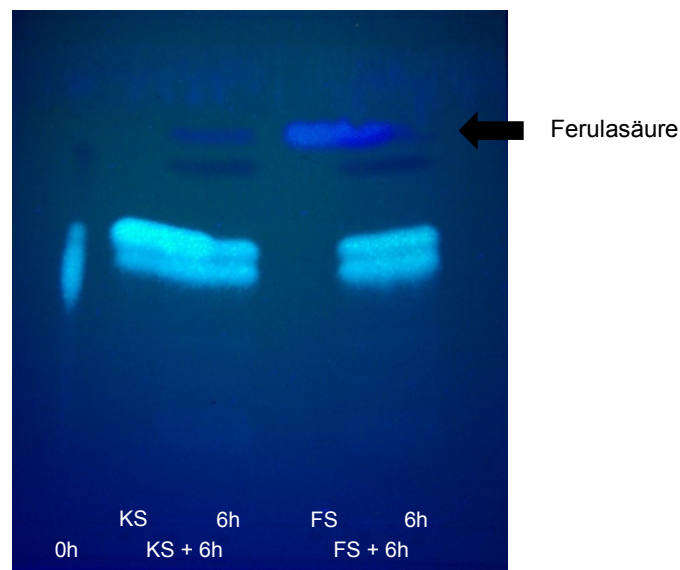


ABBILDUNG 53

Ergebnis der Dünnschichtchromatographie von LnCOMT mit Kaffeesäure (KS) und Ferulasäure (FS). Inkubationszeit betrug 0 h und 6 h; neben den Standards wurde zusätzlich noch eine Mischung mit den Proben aufgetragen.

Zusätzlich zu diesem Test wurde eine LC-MS-Messung zur Bestimmung des Endprodukts durchgeführt. Die Auswertung ist in Abbildung 54 und Abbildung 55 dargestellt. In den UV-Chromatogrammen bzw. den Extracted-Ion-Chromatogrammen (EIC) für die Masse von Ferulasäure ($[M+H]^+$) ist ein Peak zu erkennen, der mit dem des Standards übereinstimmt. Außerdem war dieser Peak auch in den Chromatogrammen von LnCOMT ohne Inkubation (0 h) nicht sichtbar. Isoferulasäure, welches die gleiche Masse wie Ferulasäure besitzt, konnte aufgrund einer anderen Retentionszeit als Produkt ausgeschlossen werden.

Aus diesen Resultaten lässt sich bestätigen, dass Kaffeesäure ein Substrat von LnCOMT ist und zu dem Produkt Ferulasäure umgesetzt wird. Die Aktivität des Enzyms war zu gering, um einen K_m -Wert für LnCOMT mit Kaffeesäure zu bestimmen. In Kapitel 3.7.3 wird ein genauerer Vergleich von LnCOMT mit der homologen Methyltransferase aus *Linum album* gegeben.

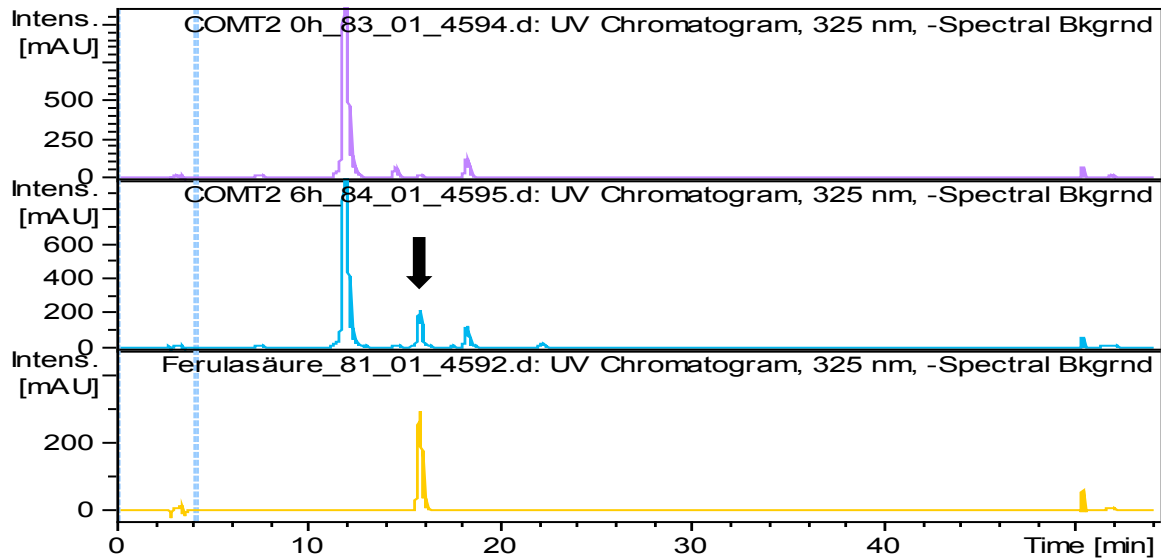


ABBILDUNG 54

Ergebnis der LC-MS-Analyse von LnCOMT-Enzymtests mit Kaffeesäure als Substrat:
 UV-Chromatogramme nach 0 h (lila) und 6 h (blau) Inkubation. Außerdem wird in Gelb das Chromatogramm des Ferulasäure-Standards gezeigt.
 Der schwarze Pfeil zeigt den Peak des entstandenen Produkts.

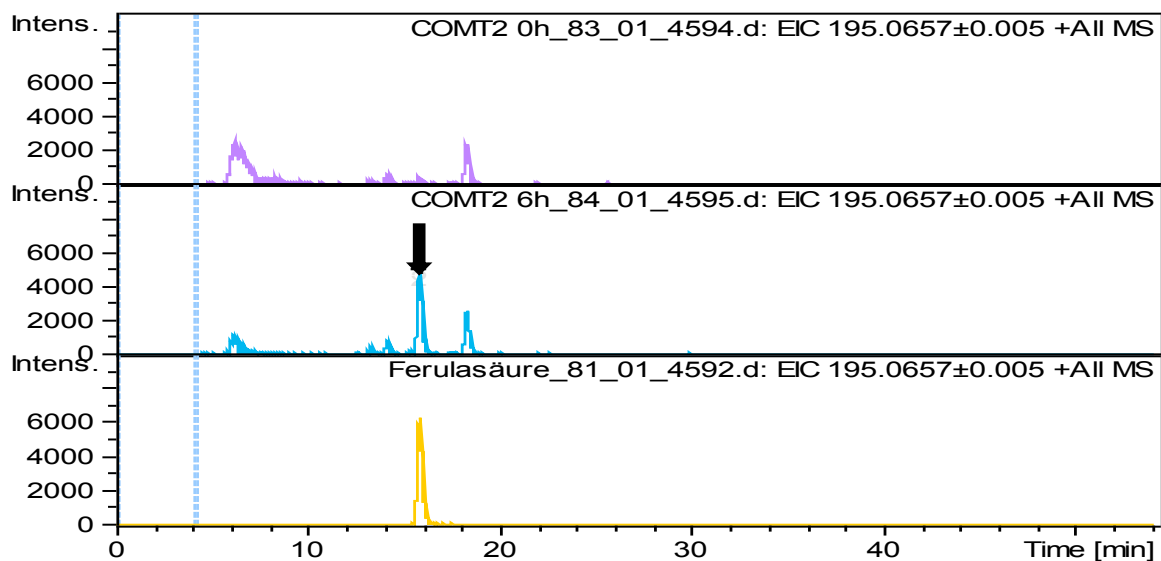


ABBILDUNG 55

Ergebnis der LC-MS-Analyse von LnCOMT-Enzymtests mit Kaffeesäure als Substrat:
 Extracted Ion Chromatogramm für die Masse von Ferulasäure ($[M+H]^+$) nach 0 h (lila) und 6 h (blau) Inkubation.
 Das Chromatogramm in Gelb zeigt das Resultat für den Standard Ferulasäure.
 Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Peak des entstandenen Produkts.

3.7.2. Kaffeesäure O-Methyltransferase aus *Linum album*

Auf der Suche nach Methyltransferasen, die in der Lignanbiosynthese involviert sind, wurde die Kaffeesäure O-Methyltransferase in *Linum album* (LaCOMT) gefunden. Die nächsten Kapitel beschreiben den Weg von der Sequenz bis hin zum funktionsfähigen Enzym.

3.7.2.1. Molekularbiologie

Für die Identifikation von Methyltransferasen in *Linum*-Arten wurden zunächst degenerierte Primer hergestellt. Diese wurden aus mehreren bekannten konservierten Bereichen, u.a. den SAM-Bindestellen, ausgesucht und sind in der Abbildung 56 dargestellt (Ibrahim et al., 1998; Joshi und Chiang, 1998).

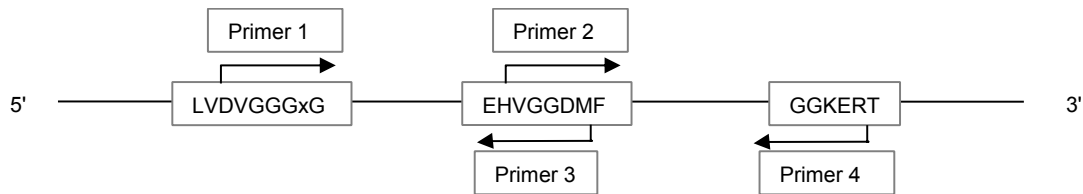


ABBILDUNG 56

Primerdesign für die Suche nach Methyltransferasen

Die durchgeführte PCR führte zu einem Fragment von 257 bp aus *Linum album*. Nachdem die 3' bzw. 5' RACE PCR zunächst nicht funktionierte, konnten mit dem SMARTer® RACE-Kit die beiden Enden der Sequenz erfolgreich identifiziert werden. Anschließend wurde die Vollängensequenz amplifiziert, die eine Länge von 1101 bp besitzt (Abbildung 57).

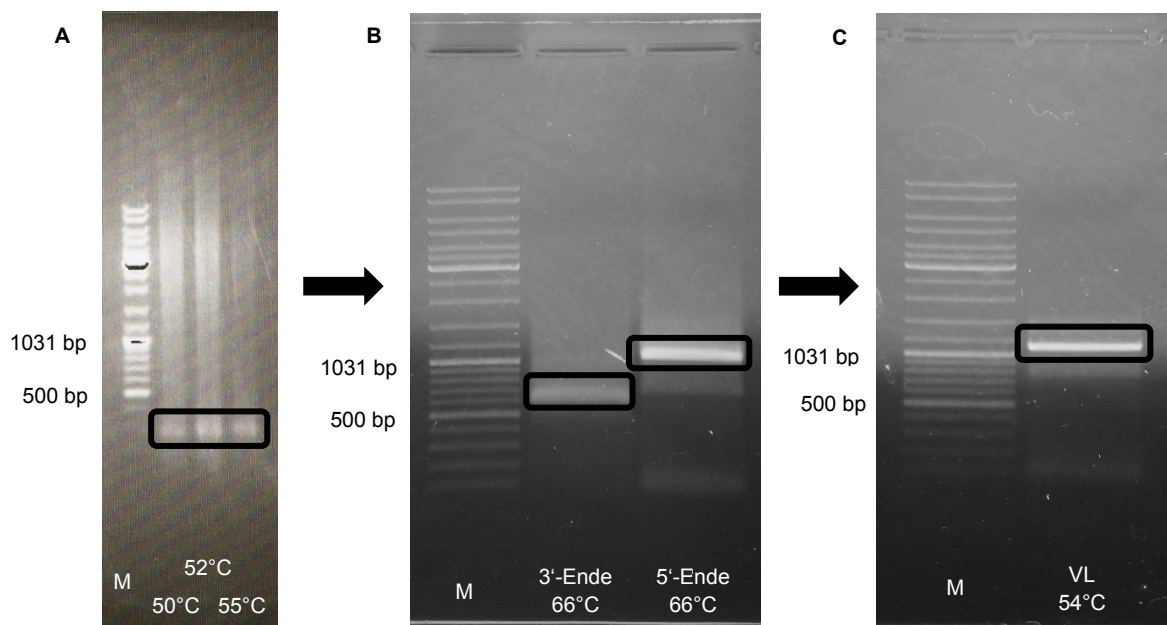


ABBILDUNG 57

- A)** Genfragment der LaCOMT nach einer PCR mit Temperaturgradienten
B) 3'- und 5'-Ende der LaCOMT
C) Volllänge (VL) der LaCOMT
(M: Marker)

Volllängensequenz von LaCOMT:

ATGGGGTCAACCCAGAAACCCAGATGACCCCAACCGTGGTCTCCGACGAGGAAGCCAACCTATTGCTAT
GCAGCTAGCCAGTGCCTCCGTCCCTACCCATGGTCCTCAAATCCGCCCTCGAACTCGACCTCCTCGAAATCAT
CGCCAAGGCCGGCCCCGGCGCTTACCTTTCCCTTCCGACATCGCCGCCCAACTCCCCACCAAGAACCCAG
AAGCCCCCGATATGCTTGATCGCATCTGCCGTCTCCTCGCTTCTACTCCGTTCTCACCTGCTCGATCCAAA
CCCTCCCCGACGGCTCCGTCCAGCGCCTCTACGGCGCCGCCCTGTCTGCAAGTTCCTCACCAAGAACGAG
GACGGCGTCTCCATCGCCGCCCTCGCTCTCATGAACCAGGACAAGGTCTCATGGAGAGCTGGTACCATTT
GAAAGATGCGGTGTTGGATGGAGGGATCCCGTTCAACAAGGCGTATGGGTTGACGGCGTTGAGTACCACG
GCACCGACCCGAGATTCAACAAGGTGTTCAACAAGGGGATGTCTGATCACTCCACCATTACGATGAAGAAGA
TCTTGAGAGCTACACCGGCTTCGACGGCCTGGAATCGCTGGTGGATGTGCGCGGCGGGACTGGAGCTGT
ACTCAGCATGATCCTGTGCAAGCATCCTTCGATCAAGGGGATCAACTTCGATCTCCCCATGTTATCGCCGA
TGCCCCGACACTACCTGGCGTGCAGCACGTTGGCGGCGACATGTTGCGCTCCGTCCCCTCCGGCGACGCC
ATTTTCATGAAGTGGATATGTCACGATTGGAGCGACGAGCACTGCCTGAAGTTCCTGAAGAACTGCTACGAG
GCGCTGCCGGCGAAGGGGAAAGTGATAGTGTGCGAGTGCATACTGCCGGTGGCGCCGGACGCGAGCCTG
GCGACGAAGAACGTGGTCCACATCGACTGCATCATGTTGGCGCACAAACCAGGAGGGAAAGAGAGGACGC
AGTCGGAGTTCGAGTCGCTGGCCAAGGGCGCCGGCTTCAAGGGCTTCAGGGTCTCTGCTCTGCTTTCAAC
ACCTACGTCATGGAGTTCCTGAAAACCTGCCGCCTGA

Aminosäuresequenz von LaCOMT:

MGSTPETQMTPTVVSDEEANLFAMQLASASVLPMLKSALELDLLEIIAKAGPGAYLSPSDIA
AQLPTKNPEAPDMLDRICRLASYSVLTCISQTLPDGSGVQRLYGAAAPVCKFLTKNEDGVSIAA
LALMNQDKVLMESWYHLKDAVLDDGGIPFNKAYGLTAFEYHGTDPRFNKVFNKGMSDHSTIT
MKKILES YTGFDGLES LVDVGGGTGAVLSMILSKHPSIKGINFDLPHVIADAPTLPGVQHVGG
DMFASVPSGDAIFMKWICHWDSDEHCLKFLKNCYEALPAKGKVIVCECILPVAPDASLATKN
VVHIDCIMLAHNPPGGKERTQSEFESLAKGAGFKGFRVLC SAFNTYVMEFLKTAA-

Die gefundene Nukleotidsequenz zeigte eine hohe Identität mit LnCOMT von 95,5%. In Tabelle 6 sind Vergleiche mit weiteren Methyltransferasen zusammengefasst. Dabei ist zu erkennen, dass die LaCOMT-Sequenz ebenfalls hohe Ähnlichkeit mit anderen Kaffeesäure O-Methyltransferasen besitzt, davon findet sich die höchste Identität von 84,7% mit einer COMT von *Linum usitatissimum*.

TABELLE 6

Erste Ergebnisse für die Analyse der gefundenen LaCOMT-Sequenz mittels NCBI Nucleotide BLAST.

Beschreibung Sequenz	Accession	Identität
<i>Linum usitatissimum</i> caffeic acid O-methyltransferase mRNA, complete cds	KC832865.1	84,7%
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> caffeic O-methyltransferase 1 mRNA, complete cds	GU109375.1	78,5%
<i>Eucalyptus urophylla</i> caffeic acid O-methyltransferase mRNA, complete cds	KF467169.1	78,4%
<i>Punica granatum</i> cultivar Hongyushizi caffeic O-methyltransferase (COMT) mRNA, complete cds	KJ713968.1	77,4%

3.7.2.2. Identifizierung des Substrats

Nachdem das Einführen der Sequenz in den Expressionsvektor pRSET C und den Expressionsstamm SoluBL21 erfolgreich durchgeführt worden war, konnte mit der Expression und Aufreinigung begonnen werden. Das Enzym hat eine Größe von etwa 40 kDa ohne His-Tag. Die SDS-PAGE (Abbildung 58) zeigte in den Elutionsfraktionen Banden in erwarteter Größe. Dies zeigte, dass die Aufreinigung gelungen war und es wurde genügend Enzym erhalten, um mit der Identifizierung des Substrats fortzufahren.

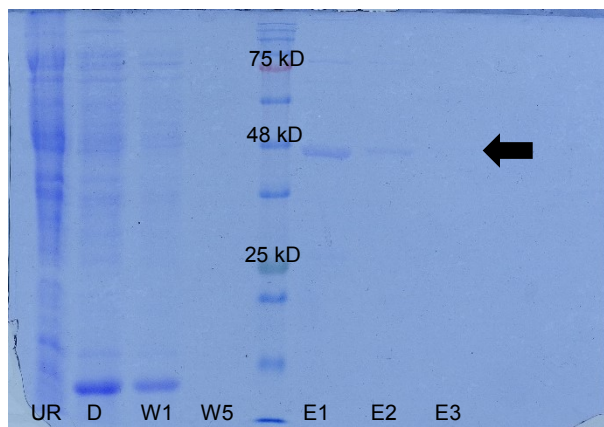


ABBILDUNG 58

SDS-PAGE der heterolog exprimierten LaCOMT bei Aufreinigung durch Metallchelate-Chromatographie

UR: Unlöslicher Rückstand; D: Durchfluss; W1: Waschfraktion 1; W5: Waschfraktion 5; E1-3: Elutionsfraktionen 1-3

Aufgrund der Ähnlichkeit der Sequenz der gefundenen Methyltransferase mit der von LnCOMT und durch die Analyse über die NCBI-Datenbank, wurde die Aktivität zuerst mit Kaffeesäure ausprobiert. Weitere Substrate, die mit der LaCOMT getestet wurden, werden in Abbildung 59 gezeigt.

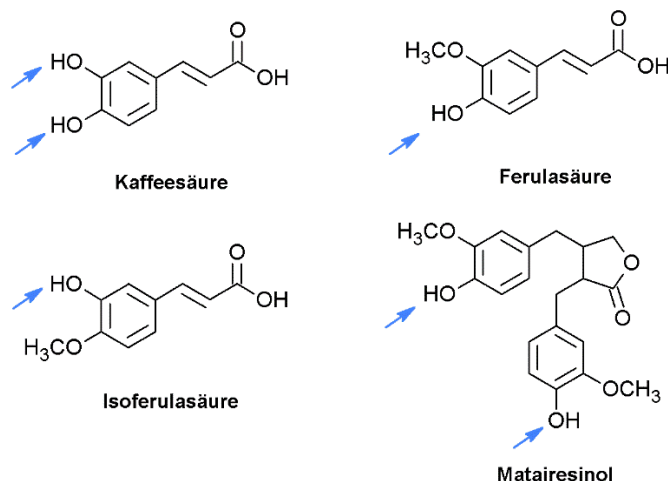


ABBILDUNG 59

Getestete Substrate mit der Methyltransferase LaCOMT. Die Pfeile kennzeichnen Hydroxylgruppen, die methyliert werden könnten.

Die Chromatogramme der Tests mit Kaffeesäure sind unten abgebildet (siehe Abbildung 60). Das Enzym hat nach 60 min die Kaffeesäure fast komplett zu Ferulasäure umgesetzt. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass Kaffeesäure das Substrat dieses Enzyms ist. Zusätzlich zeigte die Methyltransferase noch geringe Aktivität mit Isoferulasäure (siehe Abbildung 61), jedoch nicht mit Ferulasäure. Damit zeigt LaCOMT eine Präferenz für die Hydroxylgruppe in der meta-Position.

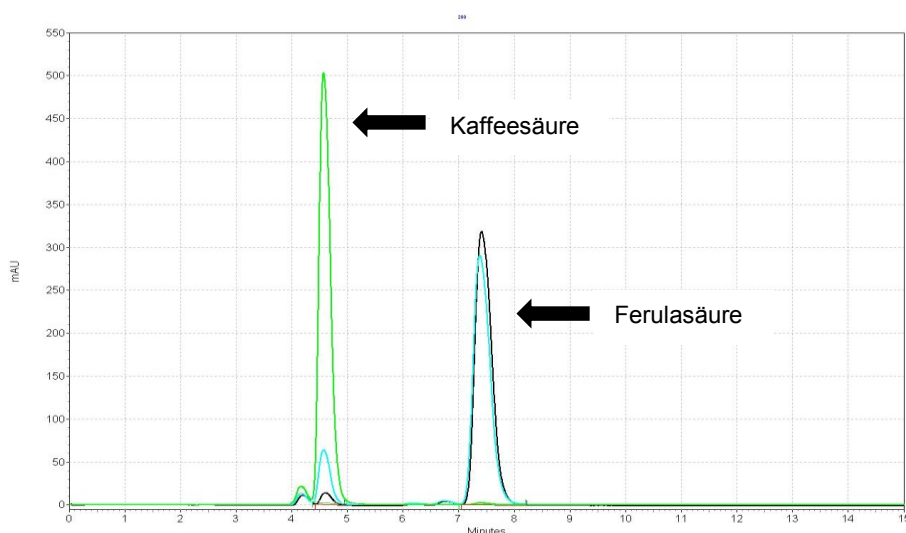


ABBILDUNG 60

Chromatogramm von LaCOMT mit Kaffeesäure (200 μ M) nach 0 min (grün), 30 min (blau) und 60 min (schwarz) Inkubation.

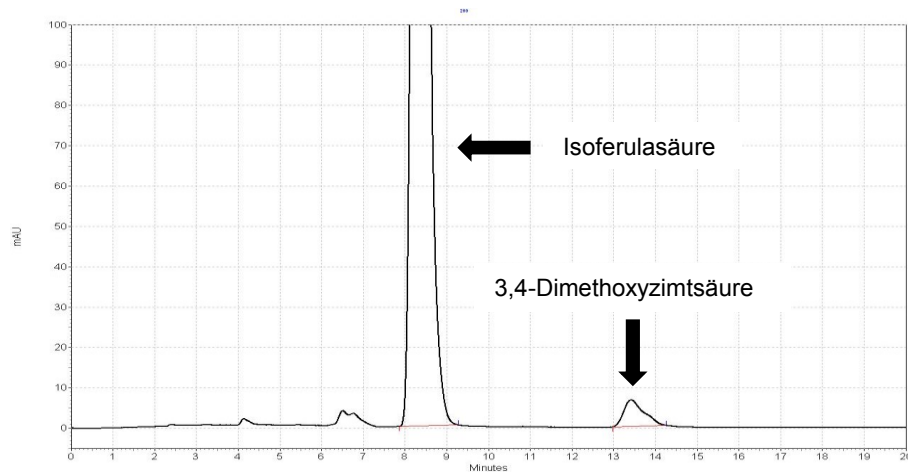


ABBILDUNG 61

Chromatogramm des Enzymtests von LaCOMT mit Isoferulasäure (200 μM) nach einer Inkubationszeit von 60 min.

3.7.2.3. Temperaturoptimum

Zur Charakterisierung des Enzyms mit dem gefundenen Substrat Kaffeesäure wurde mit der Bestimmung des Temperaturoptimums begonnen. Es zeigt sich eine Steigerung der spezifischen Aktivität von der Durchführung auf Eis bis zum Maximum von etwa 831,5 $\mu\text{kat/kg}$ bei 40°C. Danach nimmt die spezifische Aktivität kontinuierlich ab.

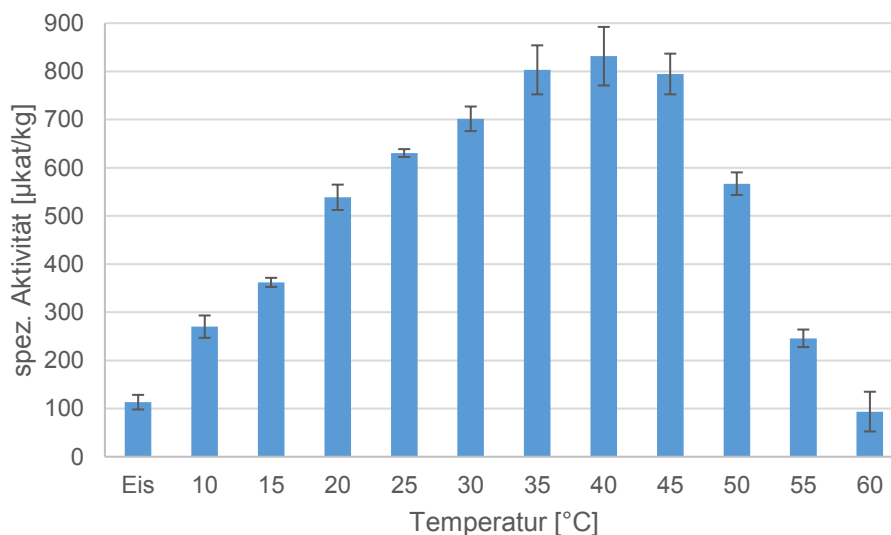


ABBILDUNG 62

Bestimmung des Temperaturoptimums für LaCOMT.

3.7.2.4. pH-Optimum

Bei der Bestimmung des pH-Optimums der LaCOMT wurden verschiedene Puffer verwendet. Zuerst wurde der Britton-Robinson-Puffer benutzt, bei dem ein pH-Bereich von 2 bis 12 eingestellt werden kann. Das Enzym zeigte ab einem pH von 5 erste Aktivität und erreichte ein Maximum von etwa 649 $\mu\text{kat/kg}$ bei pH 6. Danach sank die Aktivität deutlich ab und ab pH 9 war keine Aktivität mehr zu beobachten (Abbildung 63). In Abbildung 64 sind die Ergebnisse für die Enzymtests in Kaliumphosphat-Puffer (KPi) zu sehen. Hier war auch ein Maximum bei pH 6 mit 498,4 $\mu\text{kat/kg}$ zu erkennen, jedoch war der Unterschied zu der Aktivität bei pH 7 mit 490,4 $\mu\text{kat/kg}$ nicht so deutlich wie im Britton-Robinson-Puffer.

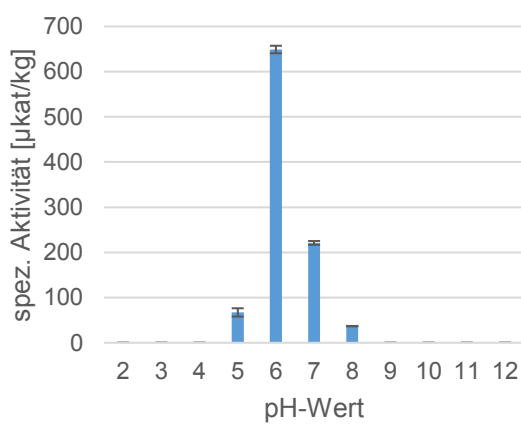


ABBILDUNG 63

Ermittlung des pH-Optimums der LaCOMT in Britton-Robinson-Puffer.

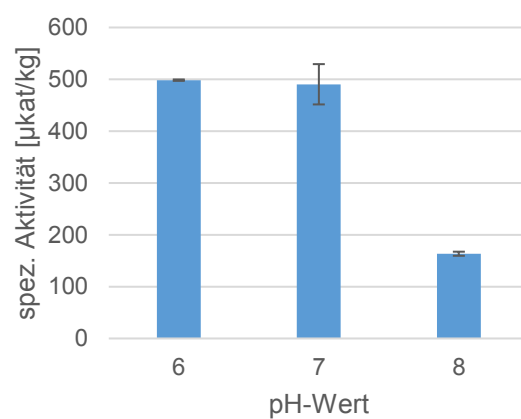


ABBILDUNG 64

Ermittlung des pH-Optimums der LaCOMT in KPi-Puffer.

3.7.2.5. Enzymkinetik

Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_m -Wert und v_{\max} für LaCOMT erfolgte für die Substrate Kaffeesäure und SAM. Die Tests wurden bei pH 7 und 30°C in Kaliumphosphat-Puffer durchgeführt.

Die Resultate für das Substrat Kaffeesäure (KS) werden in Abbildung 65 und Abbildung 66 gezeigt. Die Ermittlung des K_m -Werts für KS über nichtlineare Regression ergab einen Wert von 90,75 μM und eine Umsatzgeschwindigkeit von 4,89 mkat/kg . Die berechneten Werte sind in der Tabelle 7 zu sehen.

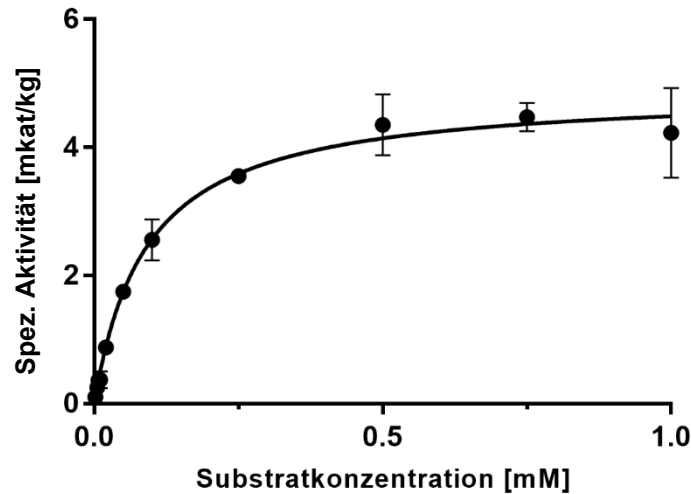


ABBILDUNG 65

Michaelis-Menten-Diagramm von LaCOMT mit dem Substrat Kaffeesäure.

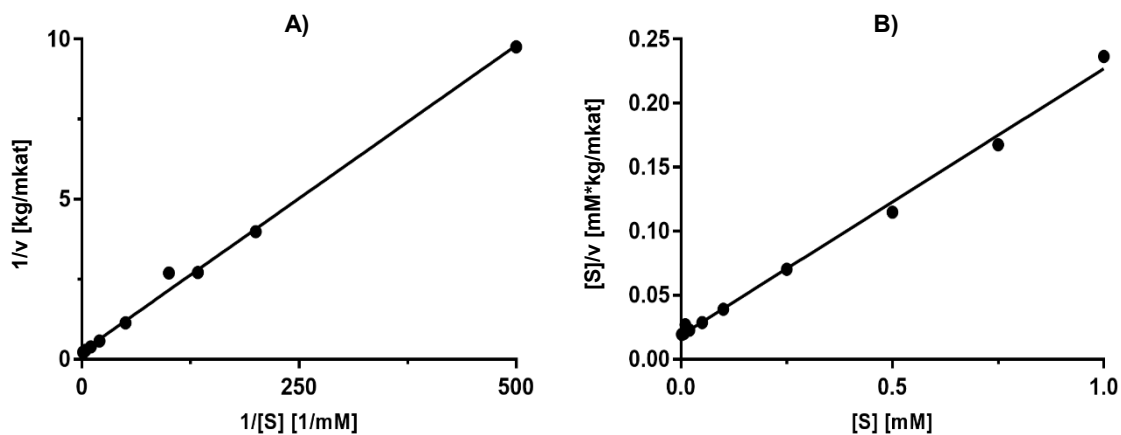


ABBILDUNG 66

A) Auswertung der Daten aus Abb. 65 nach Lineweaver-Burk

B) Auswertung der Daten aus Abb. 65 nach Hanes-Woolf

Abgebildet sind bei beiden Diagrammen die Ergebnisse von LaCOMT mit Kaffeesäure als Substrat.

TABELLE 7

Kinetische Parameter für LaCOMT mit Kaffeesäure als Substrat. K_m -Wert und v_{max} wurden nach nichtlinearer Regression bzw. zum Vergleich nach linearer Regression ermittelt ($n=4$).

Enzym	K_m KS [μM]	K_m KS [μM] nach Lineweaver- Burk	K_m KS [μM] nach Hanes- Woolf	v_{max} [μkat/kg]	Katalytische Effizienz [v_{max}/K_m]
LaCOMT	90,75	95,5	93,5	4893	53,92

Für SAM als Substrat werden die Ergebnisse der Tests in der folgenden Abbildung 67, Abbildung 68 und Tabelle 8 gezeigt. Der K_m -Wert liegt bei etwa 17,35 μM , wobei die Abweichung des Wertes berechnet über Hanes-Woolf aufgrund des Einflusses des Wertes von 2,5 mM zustande kommt. Wie in Abbildung 67 zu sehen ist, sinkt die Umsatzgeschwindigkeit bei der letzten Substratkonzentration ab. Dieser Verlauf kann durch eine Substrathemmung verursacht werden.

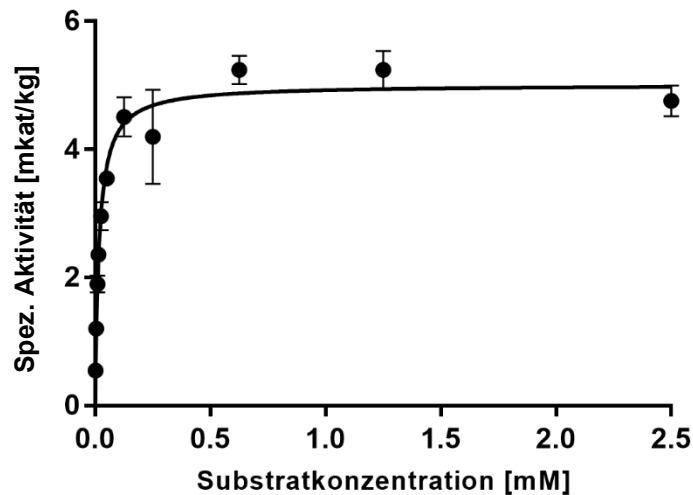


ABBILDUNG 67

Michaelis-Menten-Diagramm von LaCOMT mit SAM als Substrat.

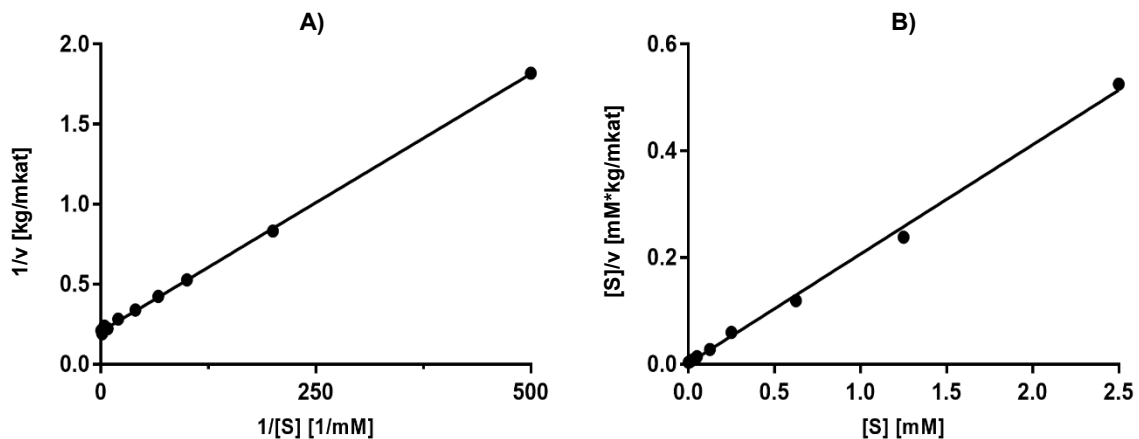


ABBILDUNG 68

A) Auswertung der Daten aus Abb. 67 nach Lineweaver-Burk

B) Auswertung der Daten aus Abb. 67 nach Hanes-Woolf

Beide Diagramme zeigen die Ergebnisse von LaCOMT mit SAM als Substrat.

TABELLE 8

Kinetische Parameter von LaCOMT mit dem Substrat SAM. K_m -Wert und v_{max} wurden nach nichtlinearer Regression bzw. zum Vergleich nach linearer Regression ermittelt (n=4).

Enzym	K_m SAM [μ M]	K_m SAM [μ M] nach Lineweaver-Burk	K_m SAM [μ M] nach Hanes-Woolf	v_{max} [μ kat/kg]
LaCOMT	17,35	16	7,5	5012

Vergleicht man die K_m -Werte der Substrate, erkennt man, dass SAM eine höhere Affinität zu LaCOMT als Kaffeesäure hat. Die Umsatzgeschwindigkeiten liegen für beide Substrate in derselben Größenordnung. Bekannte Werte von anderen Kaffeesäure O-Methyltransferasen sind in Tabelle 9 aufgeführt, wobei die aufgeführten Werte zum Teil für COMTs sehr unterschiedlich sind.

TABELLE 9

Kinetische Parameter von Kaffeesäure O-Methyltransferasen aus anderen Pflanzen.

Enzym	Accession-Nr.	K_m KS [μ M]	v_{max} KS [μ kat/kg]	K_m SAM [μ M]	v_{max} SAM [μ kat/kg]	Quelle
COMT aus <i>Ocimum basilicum</i>	AAD38189	47	19500	64	-	(Gang et al., 2002)
COMT aus <i>Medicago sativa</i>	AAB46623	43	830	-	-	(Zubieta et al., 2002)
COMT aus <i>Oryza sativa</i>	XM_480185	69	5500	51	5200	(Lin et al., 2006)
COMT aus <i>Triticum aestivum</i>	EF413031	68,75 \pm 4,21	2380 \pm 220	-	-	(Ma und Xu, 2008)
COMT aus <i>Lolium perenne</i>	AAD10253.1	10,3	2700			(Louie et al., 2010)
COMT aus <i>Brachypodium distachyon</i> (BdCOMT4)	-	187	44000	-	-	(Wu et al., 2013)
COMT aus <i>Leucaena leucocephala</i>	EF546435	220	5416	2,12	40000	(Dwivedi et al., 2014)

Die K_m -Werte für Kaffeesäure sind bei den oben gezeigten Beispielen niedriger als bei LaCOMT, hier haben nur die COMTs aus *B. distachyon* und *L. leucocephala* eine geringere Affinität zu Kaffeesäure. Der Wert der Umsatzgeschwindigkeit für Kaffeesäure liegt bei *O. sativa* und *L. leucocephala* in einem ähnlichen Bereich wie bei LaCOMT. Der K_m -Wert für SAM von LaCOMT liegt im Bereich zwischen dem von *L. leucocephala* mit einer hohen Affinität von 2,12 $\mu\text{kat/kg}$ und *O. sativa* mit 51 $\mu\text{kat/kg}$.

3.7.3. Vergleich der Kaffeesäure O-Methyltransferasen aus *L. nodiflorum* und *L. album*

Die Methyltransferasen aus *L. nodiflorum* und *L. album* besitzen eine hohe Ähnlichkeit, wenn man die Aminosäuresequenz vergleicht.

Alignment der Sequenzen von LnCOMT und LaCOMT:

LnCOMT	MGSAPETQMTPTTVVSDEEANLFAMQLASASVLPMLVLSALELDLLEIISKAGPGAYLSPS	60
LaCOMT	MGSTPETQMTPTTVVSDEEANLFAMQLASASVLPMLVLSALELDLLEIIAKAGPGAYLSPS	60
	:**:*****	
LnCOMT	DIAAQLPTKNPEAPDMLDRICRLLASYSVLTCVQTLPNGAVQRLYGAAPVCKFLTKNED	120
LaCOMT	DIAAQLPTKNPEAPDMLDRICRLLASYSVLTCVQTLPDGVSQRLYGAAPVCKFLTKNED	120
	*****:*****:*****	
LnCOMT	GVSIAALALMNQDKVIMESWYHLKDAVLDDGGIPFNKAYGMTAFEYGTDPRENKVFNKGM	180
LaCOMT	GVSIAALALMNQDKVIMESWYHLKDAVLDDGGIPFNKAYGLTAFEYGTDPRENKVFNKGM	180
	*****:*****:*****	
LnCOMT	SDHSTITMKKLLESYTGFDGLESIVGVGGGTGAVLSMILSKHPSIKGINFDLPHVIADAP	240
LaCOMT	SDHSTITMKKILESITGFDGLESIVDVGGGTGAVLSMILSKHPSIKGINFDLPHVIADAP	240
	*****:*****:*****	
LnCOMT	PLPGVKHVGGDMFASVPSGDAIFMKWICHDSDEHCLKFLKNCYEALPAKGKIVICECIL	300
LaCOMT	TLPGVQHVGGMDFASVPSGDAIFMKWICHDSDEHCLKFLKNCYEALPAKGKIVICECIL	300
	****:*****:*****	
LnCOMT	PVAPDASLATKNVHIDCIMLAHPPGGKERTQSEFESLAKGAGFKGFKVLCSAFNTYVME	360
LaCOMT	PVAPDASLATKNVHIDCIMLAHPPGGKERTQSEFESLAKGAGFKGFRVLCSAFNTYVME	360
	*****:*****:*****	
LnCOMT	FLKTAA	366
LaCOMT	FLKTAA	366

Im Alignment sind die konservierten Bereiche von Methyltransferasen nach Zubieta et al. (2002) gekennzeichnet. Aminosäuren, die rot unterlegt sind, nehmen an der Bildung des Dimers teil. In Grün sind die Aminosäuren angezeigt, die für die Substratbindung und in Gelb die Aminosäuren, die für die SAM-Bindung verantwortlich sind. Die in Blau dargestellten Aminosäuren sind an der Katalyse beteiligt. Die Abbildung 69 zeigt die Chromatogramme der Enzymtests von LaCOMT und LnCOMT mit Kaffeesäure. Hier ist ein deutlicher Unterschied in der Aktivität zu erkennen. Es ist bekannt, dass schon die Änderung nur einer Aminosäure zur

Veränderung der Substratspezifität führen kann (Frick und Kutchan, 1999). Eine erneute Sequenzierung, um Sequenzierfehler und Mutationen auszuschließen, bestätigte die gezeigte Sequenz von LnCOMT. Ein Unterschied in einem der konservierten Bereiche zeigt sich in dem Motiv der SAM-Bindestelle an Position 206. Bei LaCOMT findet man an dieser Stelle die saure Aminosäure Aspartat, während sich bei LnCOMT ein Glycin befindet. Weitere Versuche, wie z.B. die Änderung des Glycins in ein Aspartat durch Mutagenese, könnten zeigen, ob diese Veränderung zu dem Aktivitätsverlust beiträgt.

Außerdem zeigten in der Literatur beschriebene Kaffeesäure O-Methyltransferasen zusätzliche oder auch bessere Aktivität mit anderen Substraten. Dazu gehören z.B. 5-Hydroxyferulasäure, Flavonoide, 5-Hydroxyconiferaldehyd (Bugos et al., 1991; Gauthier et al., 1998; Inoue et al., 2000; Parvathi et al., 2001). Enzymtests mit diesen Substanzen könnten zeigen, ob die Methyltransferasen noch andere Substrate umsetzen können und ob LnCOMT ein anderes Substrat besser umsetzen kann.

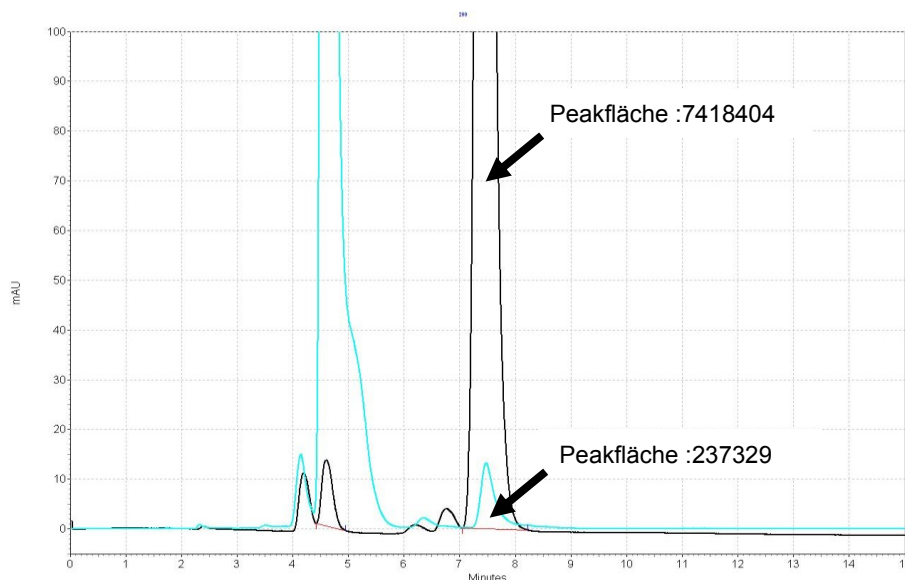


ABBILDUNG 69

Vergleich der Chromatogramme von LnCOMT (blau) und LaCOMT (schwarz) mit dem Substrat Kaffeesäure nach einer Inkubationszeit von 60 min (LnCOMT: 72 µg Protein; LaCOMT: 34,5 µg Protein).

3.8. METHYLTRANSFERASEN LnMT3 UND LnMT3s

Auf der Suche nach Methyltransferasen, die an der Lignanbiosynthese beteiligt sind, wurde eine weitere Methyltransferase aus *Linum nodiflorum* gefunden. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der molekularbiologischen Identifizierung und der anschließenden Substratsuche dargestellt.

3.8.1. Molekularbiologie

Für die Suche nach dieser Methyltransferase wurden ebenfalls die oben beschriebenen degenerierten Primer verwendet (s. 3.7.2.1). Die PCR lieferte ein Genfragment von 190 bp. Diese Sequenz konnte mit Hilfe des SMARTer® RACE-Kits verlängert werden (siehe Abbildung 70).

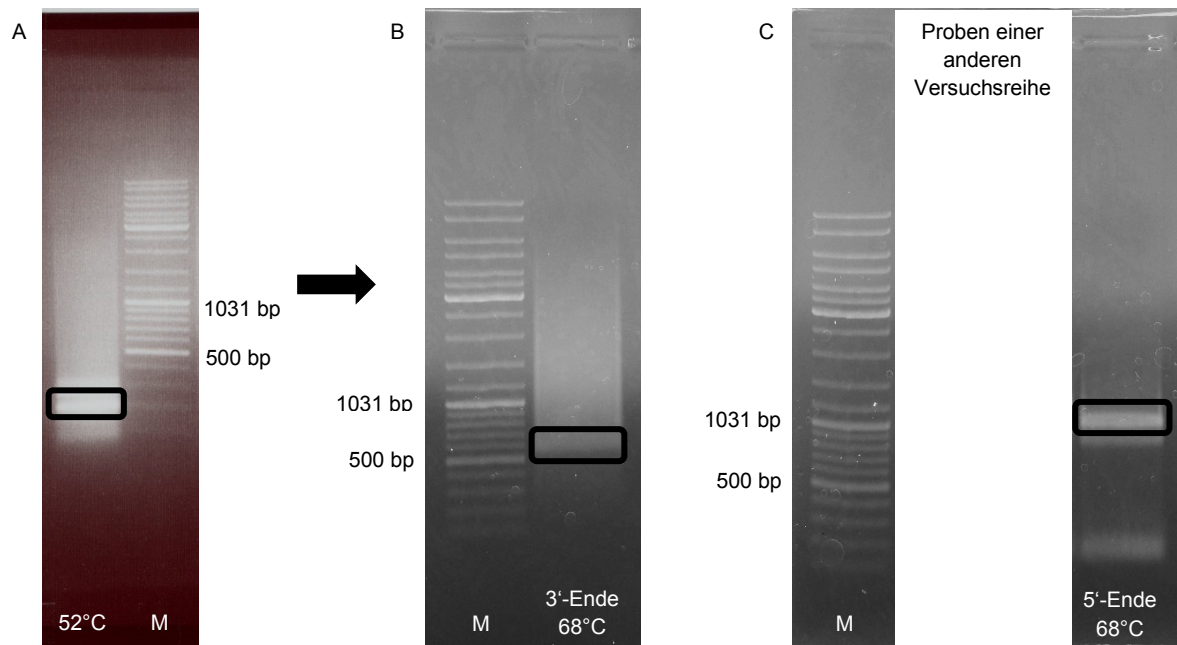


ABBILDUNG 70

Weg von dem Genfragment aus *Linum nodiflorum* zur Volllänge von LnMT3 (M: Marker).

- A) Teilsequenz der Methyltransferase
- B) 3'-Ende der Sequenz
- C) 5'-Ende der Sequenz

Die erhaltene Volllängesequenz enthielt zwei Methioninreste, die als Startcodon in Frage kamen, sodass zwei Vollängen (LnMT3 und LnMT3s) amplifiziert wurden. In den unten gezeigten Sequenzen ist das Startcodon der Methyltransferase LnMT3 in Blau gekennzeichnet und das Startcodon von LnMT3s pink gefärbt. Die Sequenzen hatten eine Länge von 1113 bp bzw. 1068 bp. Dies entspricht einer Masse von etwa 40,27 kDa bzw. 38,61 kDa.

Komplette Nucleotidsequenz von LnMT3 und LnMT3s:

ATG GGGATAAATCAACAGAGCAGAGAAAACAGAGGAGGAACAAAAATCGAAGATACAGAATCTCGTACCGGC
CAGGCCGAGCTACTAGAGCACATGTTAGCCTACGTTGTCTCCATGTCCCTCAAAGCCGCCGTCGACCTCCG
CCTCCCCGACATCATCCAATCCCACGGCGGCTCCGCCACTCTGTCCCAGCTAGTCTCCGCCATTGACCCATC
ACCTTCCCCGGACGTCTCCACCCTGGTCCGCATCATGCGCCTGTTAGTCCGCAAAAACATCTTCTCCCTTCA
ACAATCTTCCTCCGGGGAGCCGCGCTATGGCCTGACACGAGTCTCCAAATGGTTGGTCGGTGGGTCCGGCG
AACAGCAGCAGCAGCGGGGAGTCTAGCCCCTGTTCTGCTGTACGACAACCACCCTTTATCCGTGACCCCG
TGGCACCACCTCAGCGAATGCGTTAGGGAAGGCGGCAACGCGTTTCGAGAAGGCTCACGGCTGCGGGATCT
TCGAGTTCGCCTCCGGTCACCCGGAGTTTAATCGACTGTTCAACGAAGGGATGGCGTCGGCGACGCCGATT
ATGACTCCGGCGATGGCGTTGCTGGATTACGAGGGACATGGGTTCCGGTCGCTGGGTTCGCTGGTTGACGT
GGCCGGCGGGATTGGAGAGAACCTTACTGAGATTTTGAAGTTGCATCCTCATTTGAAAGGGATTAATTTGAC
TTGCCGCACGTGGTGGCCACGGCGCCGCCGTGCGACGGGGTGACGCACGTTGGTGGCGACATGTTGAGT
CCGTTCCCGCCGCCGACGCTATCATGTTGAAGTGGATATTGCACAACCTGGAGCGACGAAGATTGTGTGAGG
ATTCTGAAGAACTGTAGGAAAGCGATACCGGAGGAAACAGGGAAGCTGATTATAGTGACATGGTGTATCGAT
CCGGCGGGGAAGAGCGCTTTGACGATGCGGGTTTGGTGGTGGATCTGCTGATGATGGTGCAGACTTCTGG
TAAAGAGAGAACAGAGGATGAATGGAAGAAGATATTGGAAGGAGGAGGGTTTCCTAGGTATAAGATCATCAA
GATCCCATGCTTGTCTCCATTATCGAAGCTTATCCTAATTGA

Aminosäuresequenz von LnMT3 und LnMT3s:

MGINQQSRENRRGGTKMEDTESRTGQAELEHMLAYVVSMSLKA AVDLRLPDIIQSHGGSAT
LSQLVSAIDPSPSPDVSTLVRIMRLLVRKNIFSLQQSSSGEPYGLTRVSKWL VGGSGEQQQ
QRGSLAPVLLYDNHPLSVTPWHHLSECVREGGNAFEKAHGCGIFEFASGHPEFNRLFNEG
MASATPIMTPAMALLDYEGHGFGLSLVDVAGGIGENLTEILKLHPLKGINFDLPHVVATA
PPCDGVTHVGGDMFESVPAADAIMLKWILHNWSEDCVRILKNCRKA IPEETGKLIIVDMVID
PAGKSAFDDAGLVVDLLMMVQTS GKERTEDWKKILEGGGFPRYKIIKIPCLSSIIEAYPN-

Die Sequenzen zeigten Ähnlichkeiten von 51-62% mit verschiedenen Methyltransferasen, darunter auch eine Matairesinol O-Methyltransferase, aber einen eindeutigen Hinweis auf das Substrat des Enzyms lieferte der Vergleich nicht (Tabelle 10).

Die Sequenzen konnten anschließend erfolgreich in den Expressionsvektor pET15b und den Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS eingefügt werden.

TABELLE 10

Ergebnisse für die Analyse der gefundenen Nukleotidsequenz von LnMT3 mittels NCBI Nucleotide BLAST.

Beschreibung Sequenz	Accession	Identität
<i>Vitis vinifera</i> cultivar Carmenere O-methyltransferase OMT2 (OMT2) mRNA, OMT2-1 allele, complete cds	KC533535.1	62,1%
<i>Eriobotrya japonica</i> EjOMT3 mRNA for O-methyltransferase, complete cds	LC127203.1	61,3%
<i>Papaver somniferum</i> (R,S)-reticuline 7-O-methyltransferase mRNA, complete cds	AY268893.1	53,2%
<i>Anthriscus sylvestris</i> MROMT gene for matairesinol O-methyltransferase, complete cds	AB820127.1	51,9%

Alignment der Aminosäuresequenz von LnMT3 mit der Matairesinol O-Methyltransferase aus *Anthriscus sylvestris*:

LnMT3s	-----MEDTESRTGQAELLEHMLAYVVSMSLKA AVDLRLPDIIQSHGGSATLSQLVSAI	54
AsOMT	MSTFIGEDISAMFQGLAKCFHHIYASLDIVAIRCALELHIPDVINNHDGPITLSQIARGI	60
	: : * *: :. *: * : : : : . * : : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : *	
LnMT3s	DPSPSPDVSTLVRIMRLLVKRNIFS-LQQSSSGEPYGLTRVSKWLVGSGEQQQQRGSL	113
AsOMT	NSSS-LNFDGLSHLMMFLVKRQIFDQVHQPEIEEPLYTLNPCSKWLIQNPK-----TTI	113
	: * : . . * : : * : * : : * : . : * . * * * * . * : : : : *	
LnMT3s	APVLLYDNHPLSVTPWHHLSECVREGGNAFEKAHGCGIFEAFASGHPEFNRLFNEGMASAT	173
AsOMT	APYVMMVTNSSLRLLENLSKCIAEGGTTAMKAFGVDFWSFSLSVNPHVNDIFNEGMACGT	173
	** : : : : : : : : : : * : : * : : * : * : * : * : * : * : * : *	
LnMT3s	PIMTPAMALLDYEGHGFSGSLGSLVDVAGGIGENLTEILKLHPLKGINFDLPHVVATAPP	233
AsOMT	RITMDALM-SKYR--FDGLKGTLDVGGGLGAAINDIVTAYPHIKGINFDLPQVISTAPT	230
	* * : . * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
LnMT3s	CDGVTHVGGDMFESVPAADAIMLKWILHNWSDSDCVRLKNCRKAIP EETGKLIIVDMVI	293
AsOMT	YVGTVHVGDMFKAI PPADSIFMKSVLHDWSDSDCVQILKKCRDSIPGKTGKIIIVDTIL	290
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
LnMT3s	DPAGKSAFDDAGLVVDLMM-VQTSKGKERTEDWKKILEGGGFPRYKIIKIPCLSSII EA	352
AsOMT	HRGGDDVFEYTRIAHDLMMFSLFENGKERTVEVWKKILNEAGFYRYNVIQIPAIESIIEV	350
	. . * . . * : : : . * : * : : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
LnMT3s	YPN 355	
AsOMT	YSD 353	
	* :	

Im Alignment sind in Gelb die Aminosäuren der SAM-Bindestellen und in Blau die Aminosäuren, die katalytisch aktiv sind, gezeigt (Zubieta et al., 2001; Zubieta et al., 2002). Diese Bereiche sind konserviert und wurden für die Suche nach neuen Methyltransferasen benutzt.

Eine Ermittlung des richtigen Startcodons war aufgrund der Aktivität nicht möglich, deswegen wurde versucht das richtige Methionin mittels der Consensus-Sequenz zu finden. Diese

Sequenz umgibt das ATG-Codon und hat Einfluss auf die Translation, da sie von Ribosomen erkannt wird. Für Dikotyledonen wurde aaA(A/C)aAUGGCu als Consensus-Sequenz beschrieben (Lütcke et al., 1987; Joshi et al., 1997).

5'-Ende der Sequenz:

ATCAACGCAGAGTACATGGGGATAAATCAACAGAGCAGAGAAAACAGAGGAGGAACAAAAATGGAAGATACA

Das Startcodon von LnMT3 ist in Blau und das Startcodon von LnMT3s ist in Pink markiert. Vergleicht man die Sequenz mit der Consensus-Sequenz, lässt sich eine hohe Übereinstimmung für die Umgebung des späteren Startcodons erkennen (CAAAAATGGAA). Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, dass es sich bei diesem Methionin um das eigentliche Startcodon handelt.

3.8.2. Identifizierung des Substrats

Um Enzymtest durchzuführen, wurden beide Proteine exprimiert und aufgereinigt. Die Analyse der verschiedenen Proben der Aufreinigung ist unten abgebildet. In den Elutionsfraktionen waren deutlich Banden zu erkennen, die der Größe der Enzyme (LnMT3: ~40,27 kDa; LnMT3s: ~38,61 kDa) entsprechen (Abbildung 71 und Abbildung 72). Alle getesteten Substrate der beiden Methyltransferasen sind in Abbildung 73 gezeigt.

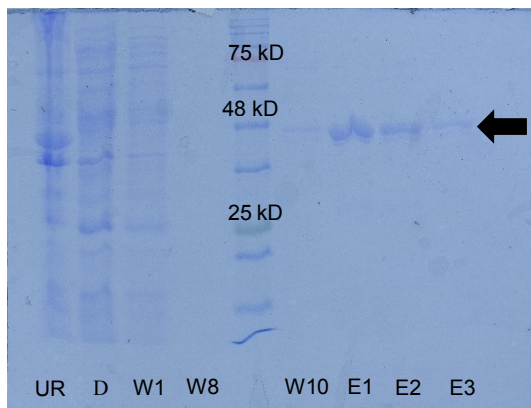


ABBILDUNG 71

SDS-PAGE der heterolog exprimierten LnMT3 bei Aufreinigung durch Metallchelate-Chromatographie

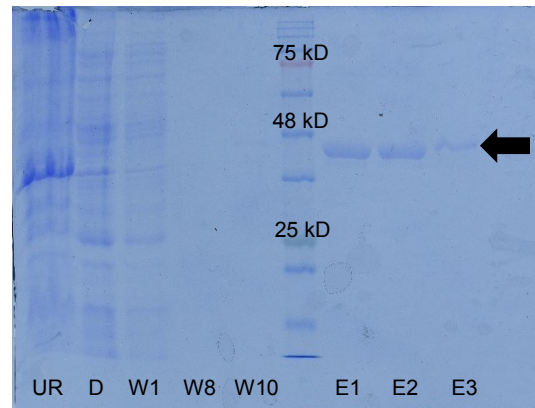


ABBILDUNG 72

SDS-PAGE der heterolog exprimierten LnMT3s bei Aufreinigung durch Metallchelate-Chromatographie

UR: Unlöslicher Rückstand; D: Durchfluss; W1: Waschfraktion 1; W8: Waschfraktion 8; W10: Waschfraktion 10; E1-3: Elutionsfraktionen 1-3

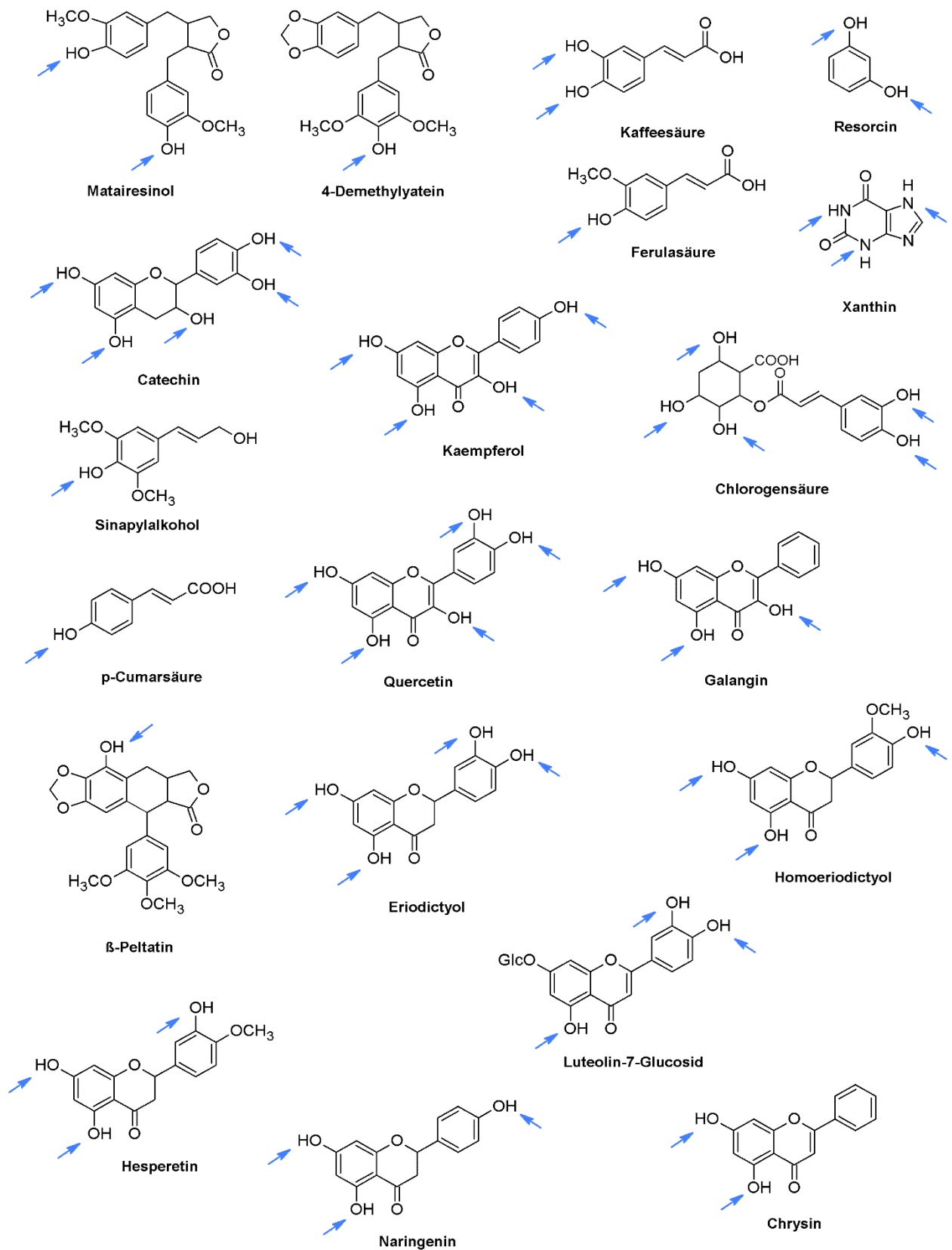


ABBILDUNG 73

Strukturformeln der mit den Methyltransferasen LnMT3 und LnMT3s getesteten Substrate. Mit blauen Pfeilen sind die Hydroxy-Gruppen gekennzeichnet, die methyliert werden können.

Von den getesteten Substraten zeigte sich nur mit Flavonoiden Aktivität. Beide Methyltransferasen waren in der Lage, dieselben Substrate umzusetzen. Die umgesetzten Flavonoide waren Quercetin, Hesperetin, Chrysin und Luteolin-7-Glucosid. Für die Berechnung der spezifischen Aktivitäten der Enzyme mit den verschiedenen Substraten standen keine Referenzen der Produkte zur Verfügung. Deshalb wurden zur ersten Einordnung der Ergebnisse die spezifischen Aktivitäten unter der Annahme berechnet, dass sich die Absorption nach der Methylierung nicht verändert. Zudem wurde versucht, den Umsatz der Ausgangsstoffe zu berechnen. Dies war aber aufgrund von Abweichungen bei den gemessenen Substratmengen nicht für alle Proben möglich.

Die Werte deuten auf einen besseren Umsatz des Flavanons Hesperetin im Vergleich zu den anderen Substraten, bei denen es sich um Flavonole (Quercetin) oder Flavone (Chrysin, Luteolin) handelt hin. Luteolin-7-Glucosid wurde nur im geringen Maß methyliert. Ein Test mit Luteolin könnte eine höhere Aktivität zeigen, da die Glucose bei Luteolin-7-Glucosid möglicherweise durch eine sterische Hinderung die Umsetzung verschlechtert. Diese Ergebnisse liefern nur Hinweise auf die Aktivität. Eine eindeutige Berechnung kann nur mit entsprechenden Referenzen durchgeführt werden.

Substrat	Spez. Aktivität mit LnMT3 [nkat/kg]	Spez. Aktivität mit LnMT3s [nkat/kg]	Umsatz [%] LnMT3	Umsatz [%] LnMT3s
Quercetin	-	1,29	-	-
Hesperetin	13,65	12,66	34,80	22,74
Chrysin	1,83	2,32	21,48	-
Luteolin-7- Glucosid	0,15	0,19	11,00	-

Von Hesperetin wurde zusätzlich eine LC-MS-Analyse durchgeführt, um einen Hinweis auf die Position der methylierten Hydroxy-Gruppe zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 74 bis Abbildung 77 gezeigt. Im UV-Chromatogramm und im Extracted-Ion-Chromatogramm für die Masse 317,1025 (Masse des methylierten Produkts, $[M+H]^+$) ist nach 1 h ein deutlicher Peak zu erkennen.

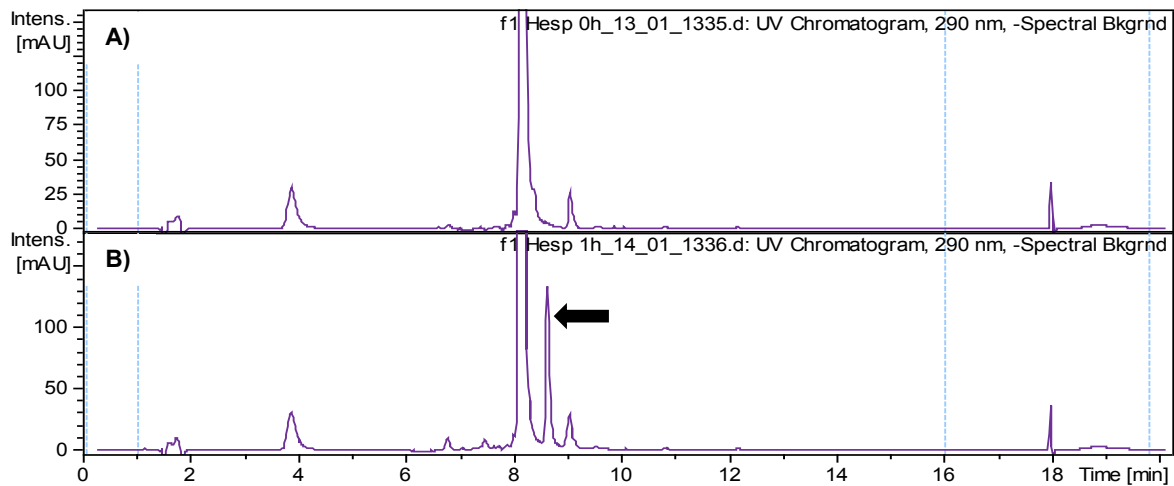


ABBILDUNG 74

UV-Chromatogramm für die Enzymtests von LnMT3 mit Hesperetin nach 0 h (A) und 1 h (B) bei einer Wellenlänge von 290 nm. Das Produkt ist durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

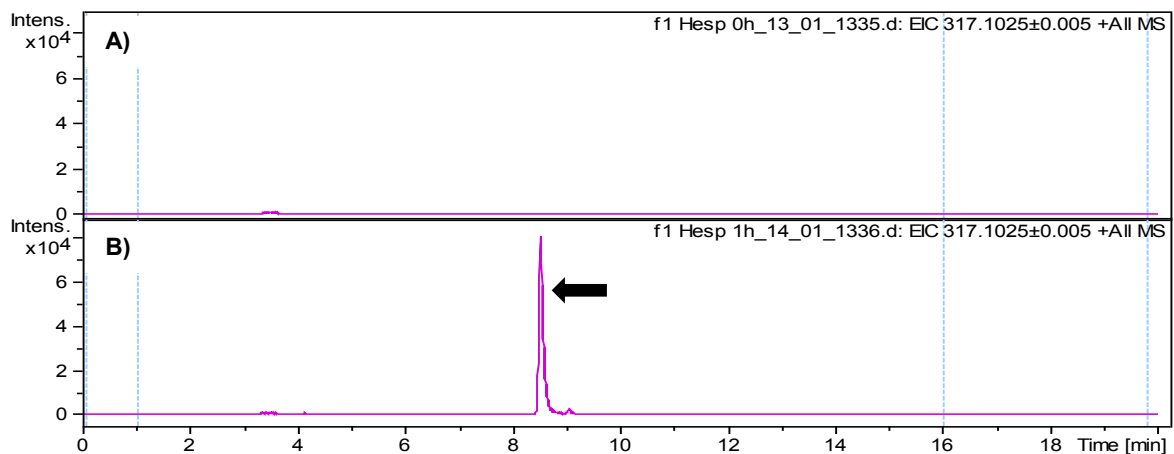


ABBILDUNG 75

Extracted-Ion-Chromatogramm (EIC) der Enzymtests von LnMT3 mit Hesperetin nach 0 h (A) und 1 h (B) für die Masse des einfach methylierten Produkts (Pfeil)

Zur Identifizierung der möglichen Methylierungsposition wurden die MS/MS-Spektren genutzt. In Abbildung 76 sind die Ergebnisse für den Enzymtest nach einer Inkubationszeit von 0 h gezeigt. Hier ist ein Peak für das Ausgangs-Ion $[M+H]^+$ von Hesperetin von etwa 303 (m/z = Masse zu Ladung) zu erkennen. Zusätzlich sind im MS/MS-Spektrum Fragmente der m/z von 153,0192 und 177,0543 zu sehen. Die Ergebnisse nach 1 h Inkubationszeit sind darunter abgebildet (Abbildung 77). Hier ist ein Peak für das Ausgangs-Ion des methylierten Produkts von Hesperetin mit einer m/z von etwa 317 $[M+H]^+$ zu sehen. Das MS/MS-Spektrum enthält weiterhin Peaks für Fragmente der m/z 153,0188 und 191,0697. Vergleicht man die Spektren der unterschiedlichen Inkubationszeiten, fällt auf, dass das Ion von 153 (m/z) in beiden auftaucht, und somit keine zusätzliche Methylgruppe aufweist. Das Fragment einer m/z von 191, das nach einer Inkubationszeit von 1 h entsteht, entspricht dem Ion von 177 aus

Abbildung 76 mit der zusätzlichen Masse von CH_2 . Eine mögliche Struktur der Fragmente aus den MS/MS-Spektrum von Hesperetin ist aus der Literatur bekannt und in Abbildung 78 zu sehen (Tsimogiannis et al., 2007; Baranowska et al., 2017).

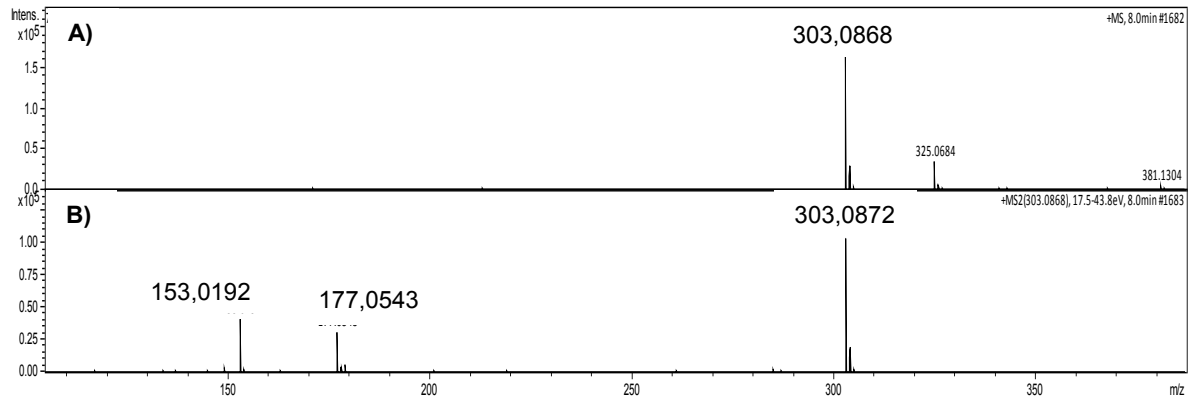


ABBILDUNG 76

Ergebnisse des Enzymtests von LnMT3 mit Hesperetin nach 0 h:

A) MS-Spektrum

B) MS-MS-Spektrum

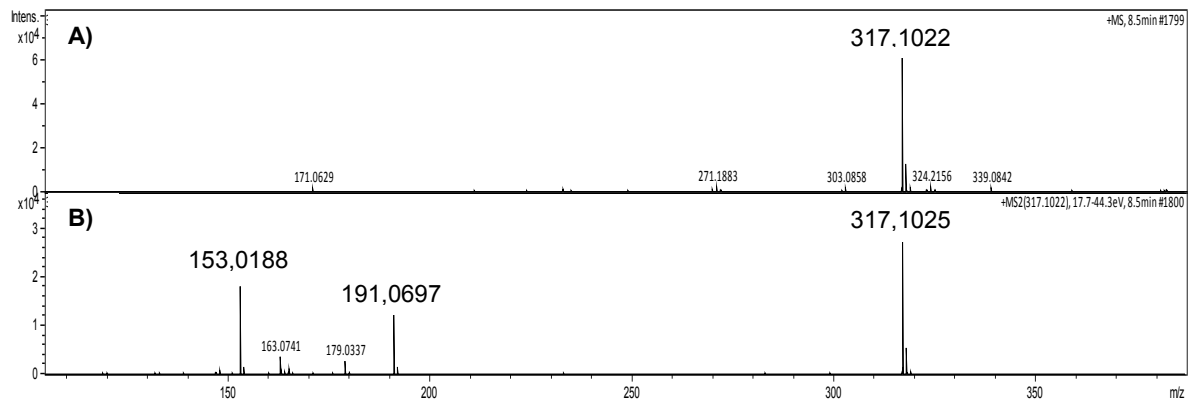
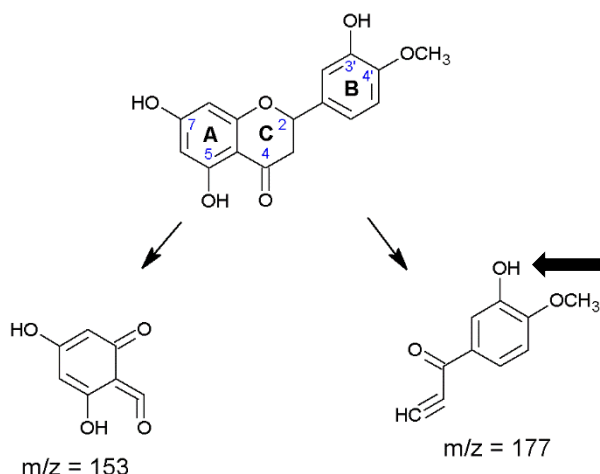


ABBILDUNG 77

Ergebnisse des Enzymtests von LnMT3 mit Hesperetin nach 1 h:

A) MS-Spektrum

B) MS-MS-Spektrum

**ABBILDUNG 78**

Struktur von Hesperetin und die vorgeschlagenen Strukturen der korrespondierenden Fragmente aus dem MS/MS-Spektrum. Der Pfeil kennzeichnet die OH-Gruppe die methyliert wird und somit ergibt sich eine m/z von etwa 191 (nach Baranowska et al., 2017).

Diese Ergebnisse deuten auf eine Methylierung in 3'-Position des B-Rings hin. Das entstandene Produkt ist 5,7-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavanon. Eine zusätzliche Bestätigung der methylierten Hydroxy-Gruppe könnte durch NMR erreicht werden. Aufgrund der Aktivität mit Chrysin nach längerer Inkubationszeit (3 h), könnten die Methyltransferasen in der Lage sein, auch andere Hydroxy-Gruppen zu methylieren. Dagegen scheint eine Methylierung der 4'-Position des B-Rings nicht möglich.

Da die Zusammensetzung der Flavonoide von *Linum nodiflorum* nicht bekannt ist, ist ein direkter Abgleich nur mit anderen Arten möglich. Bekannt sind Glykoside von Quercetin, z.B. aus *Linum album* und *Linum capitatum*. Neben diesen wurden Luteolin-Glykoside in *L. capitatum* und *L. usitatissimum* und Chrysin-Glykoside in *L. album* gefunden (Ibrahim und Shaw, 1970; Dubois und Mabry, 1971; Ilić et al., 2004; Noori und Talebi, 2017).

Bisher wurden schon mehrere Flavonoid 3'-O-Methyltransferasen in der Literatur beschrieben. Eine Methyltransferase aus *Chrysosplenium americanum* war in der Lage, Quercetin und Luteolin in der 3'-Position zu methylieren, zeigte aber auch Aktivität mit 5-Hydroxyferulasäure oder Kaffeesäure. Eine weitere Methyltransferase aus *C. americanum* konnte die 3'- und 5'-Position von methylierten Quercetin-Derivaten verwenden (Gauthier et al., 1996, 1998). Methyltransferasen, die Flavonoide spezifisch nur an 3'-Position methylieren, aber keine Aktivität mit Phenylpropanoiden zeigen, wurden ebenfalls beschrieben. Dazu gehört die 3'-O-Methyltransferase aus *Oryza sativa*, die u.a. Quercetin, Luteolin und Eriodictyol methylieren kann oder die Methyltransferase aus *Mentha x piperita*, die neben Luteolin und Quercetin auch Hesperetin, wenn auch nur im geringeren Maß, umsetzen kann (Willits et al., 2004; Kim et al., 2006).

Die Beobachtung, dass die Methyltransferasen LnMT3 und LnMT3s Flavonoide umsetzen können, spricht nicht gegen eine Beteiligung an der Lignanbiosynthese. Als Beispiel dient die Matairesinol O-Methyltransferase, gefunden in *Carthamus tinctorius*, die neben der Aktivität mit Matairesinol zusätzlich das Flavonoid Apigenin umsetzen konnte (Umezawa et al., 2013). Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit konnten hier nicht alle in der Lignanbiosynthese auftretenden Substrate (z.B. Thujaplicatin) getestet werden. Weitere Versuche mit diesen Lignanen könnten zeigen, ob man eine Teilnahme dieses Enzyms an der Lignanbiosynthese ausschließen kann.

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen von Methyltransferasen aus *Linum*-Arten

Lignane sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet und dienen in der Pflanze vor allem zur Abwehr von Schädlingen. Interessant sind Lignane durch ihre ausgeprägte biologische Aktivität. Ein Beispiel für einen medizinisch eingesetzten Stoff ist das Aryltetralinlignan Podophyllotoxin (PTOX), das cytotoxische Aktivität besitzt. Es wird zur Behandlung von Feigwarzen eingesetzt, wird aber auch in der Produktion der PTOX-Derivate Etoposid und Teniposid genutzt. Diese Arzneistoffe werden zur Therapie verschiedener Krebs-Arten angewendet. Die Gewinnung des Podophyllotoxins erfolgt aus den Arten *Podophyllum hexandrum* und *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae). Die Biosynthese von Aryltetralinlignanen wird in die frühen und späten Schritte eingeteilt. Während die frühen Reaktionsschritte mittlerweile komplett identifiziert werden konnten, sind bezüglich der späten Schritte einige Enzyme und Reaktionen unbekannt. Eine Enzymklasse, die hier von Interesse ist, sind Methyltransferasen. Bei diesen Enzymen wird eine Methylgruppe, die von einem Methylgruppendonator zur Verfügung gestellt wird, auf ein Substrat übertragen.

Die Experimente in dieser Arbeit wurden mit Suspensionskulturen von *Linum nodiflorum*, *Linum album* und *Linum flavum* aus der Familie Linaceae durchgeführt, da sie Aryltetralinlignane akkumulieren können.

Zu Beginn wurden Samen aus *Linum nodiflorum* zum Keimen gebracht und damit Kallus- und Suspensionskulturen in verschiedenen Medien angelegt. Von den anderen *Linum*-Arten waren schon die Suspensionskulturen vorhanden. In den Kulturen in CB2- und B5-Medium wurden weniger Lignane gebildet als in MSLi-Medium. Von den zwei Kulturen in MSLi-Medium akkumulierte Ln1 hauptsächlich Desoxypodophyllotoxin (DOP), aber auch 6-Methoxypodophyllotoxin (MPTOX) und Ln2 lieferte PTOX als Hauptlignan neben MPTOX und DOP. Zusätzlich wurden mit dem Elicitor Methyljasmonat (MeJa) Versuche mit beiden Suspensionskulturen Ln1 und Ln2 durchgeführt, um die Produktion der Lignane zu erhöhen. Die Ergebnisse zeigten aber nicht die gewünschte Wirkung auf den Gehalt der Lignane.

Die Suspensionskultur Ln1 wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen in Form einer Kulturcharakterisierung untersucht. Dabei wurden Daten zu Medium (Zuckergehalt, pH-Wert, Leitfähigkeit), Zellparameter (Frisch- und Trockengewicht), Lignan- und Proteingehalt, Phenylalanin Ammoniak-Lyase-Aktivität, sowie die Genexpression verschiedener Methyltransferasen gesammelt.

Neben den Untersuchungen zu den Suspensionskulturen wurden mehrere Methyltransferasen molekularbiologisch identifiziert und biochemisch charakterisiert. Die Coniferylalkohol 9-O-Methyltransferase katalysiert die Methylierung von Coniferylalkohol an der aliphatischen

Hydroxy-Gruppe. Wolters et al. (2013) hat von diesem Enzym Mutanten hergestellt, um den Reaktionsmechanismus zu identifizieren. In dieser Arbeit wurden K_m -Wert und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Mutanten C271A und C271S ermittelt. Der K_m -Wert lag für C271A bei etwa 8,91 μM und für C271S bei 2,58 μM .

Ein weiteres zu charakterisierendes Enzym war die Kaffeesäure O-Methyltransferase aus *Linum nodiflorum* (LnCOMT). Es konnte gezeigt werden, dass diese Methyltransferase Kaffeesäure zu Ferulasäure umsetzt. Die Aktivität war aber für eine Bestimmung der kinetischen Parameter zu gering.

Im Zuge der Identifizierung von Enzymen, die an der Lignanbiosynthese beteiligt sind, wurde der Fokus auf Methyltransferasen gelegt. Aus den bekannten konservierten Bereichen dieser Enzyme wurden degenerierte Primer erstellt, die über eine PCR Teilsequenzen von Methyltransferasen aus *Linum album* und *Linum nodiflorum* lieferte.

Die Methyltransferase aus *Linum album* (LaCOMT) zeigte eine hohe Aktivität mit Kaffeesäure und eine geringere mit Isoferulasäure. Mit Kaffeesäure hatte das Enzym ein Temperaturoptimum von 40°C und ein pH-Optimum von 6. Der ermittelte K_m -Wert für Kaffeesäure lag bei etwa 90,75 μM und für SAM bei 17,35 μM . Der Vergleich zwischen LaCOMT und LnCOMT ergab zwar eine Identität von 95,5% (Nukleotidsequenz), trotzdem wurde ein deutlicher Unterschied in der Aktivität beobachtet.

Nach erfolgreicher Sequenzierung der Volllänge der Methyltransferase LnMT3 aus *Linum nodiflorum* zeigte sich, dass zwei Methionincodons als Startcodon in Frage kamen. Deshalb wurden zwei Methyltransferasen (LnMT3 und LnMT3s) isoliert, kloniert und exprimiert. Beide Enzyme wurden auf ihre Aktivität getestet und setzten die gleichen Substrate um, weshalb eine Auswahl des richtigen Startcodons nicht möglich war. Die umgesetzten Substrate waren die Flavonoide Hesperetin, Quercetin, Chrysin und in einem geringeren Maß auch Luteolin-7-Glucosid. Bei Hesperetin konnte die Methylierung der 3'-Hydroxygruppe nachgewiesen werden. Nicht alle Substrate aus der Lignanbiosynthese waren verfügbar, deshalb müssen in Zukunft weitere Tests zeigen, ob LnMT3/LnMT3s nicht doch an der Lignanbiosynthese beteiligt sind.

SUMMARY

Investigations on methyltransferases in *Linum* species

Lignans are widely distributed throughout the plant kingdom and play a role in the defense against herbivores and microorganisms. These compounds are of interest due to their distinct biological activity. An example for a medically used lignan is the aryltetralin lignan podophyllotoxin (PTOX) that has cytotoxic properties. It is applied against warts but also serves in the production of the PTOX derivatives etoposide and teniposide. These drugs are utilized in cancer therapy. The phosphate derivative of etoposide (Etopophos®) is also used because it shows a better solubility. PTOX is extracted from *Podophyllum hexandrum* and *P. peltatum* (Berberidaceae). The biosynthetic pathway of aryltetralin lignans can be divided into the early and late steps. The early steps have been completely elucidated, whereas from the late steps only few enzymes and reactions are known. An enzyme class which especially is of interest are methyltransferases. These transfer a methyl group from a methyl group donor to the substrate.

The experiments described in this work were conducted with suspension cultures of *Linum nodiflorum*, *L. album* and *L. flavum* belonging to the family Linaceae. These *Linum* species accumulate aryltetralin lignans.

To start the investigations, seeds from *Linum nodiflorum* were germinated and callus and suspension cultures were established from these shoots in different media. Suspension cultures from the other plants already existed. The established cultures in CB2 and B5 medium produced less lignans than those in MSLi medium. Regarding the two cultures in MSLi medium, Ln1 mainly produced deoxypodophyllotoxin (DOP) but also 6-methoxypodophyllotoxin (MPTOX). Ln2 accumulated PTOX as principal lignan apart from MPTOX and DOP. Additionally, experiments were performed with the elicitor methyl jasmonate to observe the possible enhancement of the lignan amount in suspension cultures Ln1 and Ln2. The results did not show the desired effects on the lignan content.

Suspension culture Ln1 was examined in a culture characterization over a period of 14 days. Data were collected concerning the medium (sugar content, pH value, conductivity), cell parameters (fresh and dry weight), lignan and protein content, phenylalanine ammonia-lyase activity and the gene expression of various methyltransferases.

Besides the investigations on the suspension cultures, a biochemical characterization of different methyltransferases was also conducted. Coniferyl alcohol 9-O-methyltransferase catalyzes the methylation of an aliphatic hydroxy group. Wolters et al., (2013) produced mutants of this enzyme to identify the reaction mechanism. The task was to determine the K_m

value and maximal reaction rate of the mutants C271A and C271S. The K_m value for C271A was about 8.91 μM and for C271S 2.58 μM .

The second enzyme from *Linum nodiflorum* that was characterized was a putative caffeic acid O-methyltransferase (LnCOMT). It was shown that it catalyzes the reaction from caffeic acid to ferulic acid. Yet, the activity was too low to determine any biochemical parameters.

In the process of identifying enzymes involved in lignan biosynthesis, the focus was on methyltransferases. Degenerate primer from conserved regions were used in PCR and two partial sequences of methyltransferases from *Linum album* and *Linum nodiflorum* were received.

The methyltransferase from *Linum album* (LaCOMT) showed a high activity with caffeic acid but also a lower activity with isoferulic acid. The optimal temperature with caffeic acid was 40°C and the optimal pH was 6. The calculated K_m value was 90.75 μM for caffeic acid and for SAM 17.35 μM . The comparison of LaCOMT and LnCOMT showed an identity of 95.5% (nucleotide sequence), but a considerable difference in their activity was detected.

After successfully obtaining the full-length sequence of the methyltransferase LnMT3 from *Linum nodiflorum*, two possible start codons were identified. For this reason, two methyltransferases (LnMT3 and LnMT3s) were isolated, cloned and expressed. Both enzymes were tested to check their activity, and both converted the same substrates. A clarification of the actual start codon was not possible. The utilized substrates were the flavonoids hesperetin, quercetin, chrysin and to a lower extent luteolin-7-glucoside. Regarding hesperetin a methylation of the 3'-hydroxy group was proven. Tests could not be performed with all substrates from the lignan biosynthesis due to their unavailability, though future tests can show whether LnMT3/LnMT3s are involved in this biosynthesis.

4. LITERATURVERZEICHNIS

- Adlercreutz, H., 1995. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environmental Health Perspectives* 103 (Suppl 7), 103–112.
- Alfermann, A.W., Petersen, M., 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 43 (2), 199–205.
- Baranowska, I., Hejniak, J., Magiera, S., 2017. LC-ESI-MS/MS method for the enantioseparation of six flavanones. *Anal. Methods* 9 (6), 1018–1030.
- Bäumler, S., 2007. *Heilpflanzenpraxis heute: Porträts, Rezepturen, Anwendung*, 1. Aufl. ed. Elsevier Urban & Fischer, München, 989 pp.
- Berim, A., Ebel, R., Schneider, B., Petersen, M., 2008. UDP-glucose:(6-methoxy)podophyllotoxin 7-O-glucosyltransferase from suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Phytochemistry* 69 (2), 374–381.
- Berim, A., Schneider, B., Petersen, M., 2007. Methyl allyl ether formation in plants: Novel S-adenosyl l-methionine:coniferyl alcohol 9-O-methyltransferase from suspension cultures of three *Linum* species. *Plant Molecular Biology* 64 (3), 279–291.
- Berim, A., Spring, O., Conrad, J., Maitrejean, M., Boland, W., Petersen, M., 2005. Enhancement of lignan biosynthesis in suspension cultures of *Linum nodiflorum* by coronalon, indanoyl-isoleucine and methyl jasmonate. *Planta* 222 (5), 769–776.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–254.
- Broomhead, A.J., Rahman, M.M.A., Dewick, P.M., Jackson, D.E., Lucas, J.A., 1991. Matairesinol as precursor of *Podophyllum* lignans. *Phytochemistry* 30 (5), 1489–1492.
- Bugos, R.C., Chiang, V.L.C., Campbell, W.H., 1991. cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen. *Plant Molecular Biology* 17 (6), 1203–1215.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical biochemistry* (162), 156–159.
- Chu, A., Dinkova, A., Davin, L.B., Bedgar, D.L., Lewis, N.G., 1993. Stereospecificity of (+)-pinoresinol and (+)-lariciresinol reductases from *Forsythia intermedia*. *J. Biol. Chem.* 268 (36), 27026–27033.
- Davin, L.B., Wang, H.-B., Crowell, A.L., Bedgar, D.L., Martin, D.M., Sarkanen, S., Lewis, N.G., 1997. Stereoselective Bimolecular Phenoxy Radical Coupling by an Auxiliary (Dirigent) Protein Without an Active Center. *Science* 275 (5298), 362–367.
- Diederichson, A., Richards, K., 2003. Cultivated flax and the genus *Linum* L.: Taxonomy and germplasm conservation, in: Muir, A.D., Westcott, N.D. (Eds.), *Flax. The genus Linum*. Routledge, London, New York.

- Dinkova-Kostova, A.T., Gang, D.R., Davin, L.B., Bedgar, D.L., Chu, A., Lewis, N.G., 1996. (+)-Pinoresinol/(+)-Lariciresinol Reductase from *Forsythia intermedia*. J. Biol. Chem. 271 (46), 29473–29482.
- Dixon, R.A., Chen, F., Guo, D., Parvathi, K., 2001. The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? Phytochemistry 57 (7), 1069–1084.
- Dressler, S., Repplinger, M., Bayer, C., 2014. Linaceae, in: Kubitzki, K. (Ed.), Flowering Plants. Eudicots. Malpighiales. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l., pp. 237–246.
- Dubois, J., Mabry, T.J., 1971. The C-glycosylflavonoids of flax, *Linum usitatissimum*. Phytochemistry 10 (11), 2839–2840.
- Dwivedi, U.N., Gupta, P., Pandey, V.P., Singh, S., Singh, R., 2014. Caffeic acid O-methyltransferase from *Leucaena leucocephala*: Cloning, expression, characterization and molecular docking analyses. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 106, 63–70.
- Federolf, K., Alfermann, A.W., Fuss, E., 2007. Aryltetralin-lignan formation in two different cell suspension cultures of *Linum album*: deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a key enzyme for the formation of 6-methoxypodophyllotoxin. Phytochemistry 68 (10), 1397–1406.
- Ferrer, J.-L., Austin, M.B., Stewart, C., Noel, J.P., 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant physiology and biochemistry: PPB 46 (3), 356–370.
- Frick, S., Kutchan, T.M., 1999. Molecular cloning and functional expression of O-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. The Plant Journal 17 (4), 329–339.
- Gang, D.R., Costa, M.A., Fujita, M., Dinkova-Kostova, A.T., Wang, H.-B., Burlat, V., Martin, W., Sarkanen, S., Davin, L.B., Lewis, N.G., 1999. Regiochemical control of monolignol radical coupling: A new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. Chemistry & Biology 6 (3), 143–151.
- Gang, D.R., Lavid, N., Zubieta, C., Chen, F., Beuerle, T., Lewinsohn, E., Noel, J.P., Pichersky, E., 2002. Characterization of Phenylpropene O-Methyltransferases from Sweet Basil: Facile Change of Substrate Specificity and Convergent Evolution within a Plant O-Methyltransferase Family. The Plant Cell 14 (2), 505–519.
- Gao, R., Gao, C., Tian, X., Yu, X., Di, X., Xiao, H., Zhang, X., 2004. Insecticidal activity of deoxypodophyllotoxin, isolated from *Juniperus sabina* L., and related lignans against larvae of *Pieris rapae* L. Pest Management Science 60 (11), 1131–1136.
- Gauthier, A., Gulick, P.J., Ibrahim, R.K., 1996. cDNA cloning and characterization of a 3'/5'-O-methyltransferase for partially methylated flavonols from *Chrysosplenium americanum*. Plant Molecular Biology 32 (6), 1163–1169.

- Gauthier, A., Gulick, P.J., Ibrahim, R.K., 1998. Characterization of Two cDNA Clones Which Encode O-Methyltransferases for the Methylation of both Flavonoid and Phenylpropanoid Compounds. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 351 (2), 243–249.
- Gordaliza, M., García, P.A., del Corral, J.M.M., Castro, M.A., Gómez-Zurita, M.A., 2004. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 44 (4), 441–459.
- Hahlbrock, K., 1976. Regulation of Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity in Cell-Suspension Cultures of *Petroselinum hortense*. *European Journal of Biochemistry* 63 (1), 137–145.
- Hahlbrock, K., Schröder, J., 1975. Specific effects on enzyme activities upon dilution of *Petroselinum hortense* cell cultures into water. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 171 (2), 500–506.
- Harmatha, J., Dinan, L., 2003. Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. *Phytochemistry Reviews* 2 (3), 321–330.
- Heimendahl, C.B.I. von, Schäfer, K.M., Eklund, P., Sjöholm, R., Schmidt, T.J., Fuss, E., 2005. Pinoresinol-lariciresinol reductases with different stereospecificity from *Linum album* and *Linum usitatissimum*. *Phytochemistry* 66 (11), 1254–1263.
- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R.M., Fischer, R., 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature biotechnology* 22 (11), 1415–1422.
- Ibrahim, R.K., Bruneau, A., Bantignies, B., 1998. Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Molecular Biology* 36 (1), 1–10.
- Ibrahim, R.K., Shaw, M., 1970. Phenolic constituents of the oil flax (*Linum usitatissimum*). *Phytochemistry* 9 (8), 1855–1858.
- Ilić, S.V., Konstantinović, S.S., Todorović, Z.B., 2004. Flavonoids from flower of *Linum capitatum* Kit. *Facta universitatis-series: Physics, Chemistry and Technology* 3 (1), 67–71.
- Imbert, T.F., 1998. Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie* 80 (3), 207–222.
- Inoue, K., Parvathi, K., Dixon, R.A., 2000. Substrate Preferences of Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid 3/5-O-Methyltransferases in Developing Stems of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 375 (1), 175–182.
- Jackson, D.E., Dewick, P.M., 1984a. Aryltetralin lignans from *Podophyllum hexandrum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry* 23 (5), 1147–1152.
- Jackson, D.E., Dewick, P.M., 1984b. Biosynthesis of *Podophyllum* lignans—II. Interconversions of aryltetralin lignans in *Podophyllum hexandrum*. *Phytochemistry* 23 (5), 1037–1042.
- Joshi, C.P., Chiang, V.L., 1998. Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Molecular Biology* 37 (4), 663–674.

- Joshi, C.P., Zhou, H., Huang, X., Chiang, V.L., 1997. Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Molecular Biology* 35 (6), 993–1001.
- Kamil, W.M., Dewick, P.M., 1986a. Biosynthesis of the lignans α - and β -peltatin. *Phytochemistry* 25 (9), 2089–2092.
- Kamil, W.M., Dewick, P.M., 1986b. Biosynthetic relationship of aryltetralin lactone lignans to dibenzylbutyrolactone lignans. *Phytochemistry* 25 (9), 2093–2102.
- Kim, B.-G., Lee, Y., Hur, H.-G., Lim, Y., Ahn, J.-H., 2006. Flavonoid 3'-O-methyltransferase from rice: cDNA cloning, characterization and functional expression. *Phytochemistry* 67 (4), 387–394.
- Kolewe, M.E., Gaurav, V., Roberts, S.C., 2008. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Molecular pharmaceutics* 5 (2), 243–256.
- Konuklugil, B., Schmidt, T.J., Alfermann, A.W., 1999. Accumulation of aryltetralin lactone lignans in cell suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Planta Medica* 65 (06), 587–588.
- Kranz, K., Petersen, M., 2003. β -Peltatin 6-O-methyltransferase from suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Phytochemistry* 64 (2), 453–458.
- Kuhlmann, S., 2004. Untersuchungen zur Rolle von Cytochrom P450-Enzymen in der Biosynthese von Aryltetralin-Lignanen in Zellkulturen von *Linum spec.*
- Kuhlmann, S., Kranz, K., Lücking, B., Alfermann, A.W., Petersen, M., 2002. Aspects of cytotoxic lignan biosynthesis in suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Phytochemistry Reviews* 1 (1), 37–43.
- Lämmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680.
- Lau, W., Sattely, E.S., 2015. Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone. *Science* 349 (6253), 1224–1228.
- Lewis, N.G., Davin, L.B., 1999. Lignans: Biosynthesis and Function, in: Barton, D. (Ed.), *Comprehensive natural products chemistry*. Elsevier, Amsterdam u.a., pp. 639–712.
- Lin, F., Yamano, G., Hasegawa, M., Anzai, H., Kawasaki, S., Kodama, O., 2006. Cloning and functional analysis of caffeic acid 3-O-methyltransferase from rice (*Oryza sativa*). *J. Pestic. Sci.* 31 (1), 47–53.
- Louie, G.V., Bowman, M.E., Tu, Y., Mouradov, A., Spangenberg, G., Noel, J.P., 2010. Structure-Function Analyses of a Caffeic Acid O-Methyltransferase from Perennial Ryegrass Reveal the Molecular Basis for Substrate Preference. *The Plant Cell* 22 (12), 4114–4127.
- Lütcke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F., Scheele, G.A., 1987. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *The EMBO Journal* 6 (1), 43–48.

- Ma, Q.-H., Xu, Y., 2008. Characterization of a caffeic acid 3-O-methyltransferase from wheat and its function in lignin biosynthesis. *Biochimie* 90 (3), 515–524.
- Mabinya, L.V., Mafunga, T., Brand, J.M., 2006. Determination of ferulic acid and related compounds by thin layer chromatography. *African Journal of Biotechnology* 5 (13).
- Marques, J.V., Kim, K.-W., Lee, C., Costa, M.A., May, G.D., Crow, J.A., Davin, L.B., Lewis, N.G., 2013. Next generation sequencing in predicting gene function in podophyllotoxin biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 288 (1), 466–479.
- McDill, J., Repplinger, M., Simpson, B.B., Kadereit, J.W., 2009. The Phylogeny of *Linum* and Linaceae Subfamily Linoideae, with Implications for Their Systematics, Biogeography, and Evolution of Heterostyly. ISSN: 0363-6445 34 (2), 386–405.
- McDill, J.R., Simpson, B.B., 2011. Molecular phylogenetics of Linaceae with complete generic sampling and data from two plastid genes. *Bot J Linn Soc* 165 (1), 64–83.
- Molog, G., Empt, U., Kuhlmann, S., van Uden, W., Pras, N., Alfermann, A., Petersen, M., 2001. Deoxypodophyllotoxin 6-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase from cell cultures of *Linum flavum* involved in the biosynthesis of cytotoxic lignans. *Planta* 214 (2), 288–294.
- Moss, G.P., 2000. Nomenclature of Lignans and Neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* 72 (8), 1493–1523.
- Naito, T., Niitsu, K., Ikeya, Y., Okada, M., Mitsuhashi, H., 1992. A phthalide and 2-farnesyl-6-methyl benzoquinone from *Ligusticum chuangxiong*. *Phytochemistry* 31 (5), 1787–1789.
- Nakatani, N., Ikeda, K., Kikuzaki, H., Kido, M., Yamaguchi, Y., 1988. Diaryldimethylbutane lignans from *Myristica argentea* and their antimicrobial action against *Streptococcus mutans*. *Phytochemistry* 27 (10), 3127–3129.
- Noel, J.P., Dixon, R.A., Pichersky, E., Zubieta, C., Ferrer, J.-L., 2003. Chapter two Structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules, in: Romeo, J.T. (Ed.), *Recent Advances in Phytochemistry: Integrative Phytochemistry: from Ethnobotany to Molecular Ecology*, vol. 37. Elsevier, pp. 37–58.
- Noori, M., Talebi, S.M., 2017. A chemotaxonomic study of some Iranian *Linum* taxa. *Phytologia Balcanica: International Journal of Balkan Flora and Vegetation* 23 (1), 23–29.
- Norikazu Sakakibara, Shiro Suzuki, Toshiaki Umezawa, Mikio Shimada, 2003. Biosynthesis of yatein in *Anthriscus sylvestris*. *Organic & Biomolecular Chemistry* 1 (14), 2474–2485.
- Ockendon, D.J., Walters, S.M., 1968. *Linum* L. *Flora Europaea* 2, 206–211.
- Parvathi, K., Chen, F., Guo, D., Blount, J.W., Dixon, R.A., 2001. Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols. *The Plant Journal* 25 (2), 193–202.

- Petersen, M., Alfermann, A.W., 2001. The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology* 55 (2), 135–142.
- Phyton Biotech. <https://phytonbiotech.com/apis/paclitaxel/>. Accessed 2 April 2018.
- Protalix Biotherapeutics. <http://protalix.com/>. Accessed 1 Mai 2018.
- Ragamustari, S.K., Nakatsubo, T., Hattori, T., Ono, E., Kitamura, Y., Suzuki, S., Yamamura, M., Umezawa, T., 2013. A novel O-methyltransferase involved in the first methylation step of yatein biosynthesis from matairesinol in *Anthriscus sylvestris*. *Plant Biotechnology* 30 (4), 375–384.
- Ragamustari, S.K., Yamamura, M., Ono, E., Hattori, T., Suzuki, S., Suzuki, H., Shibata, D., Umezawa, T., 2014. Substrate-enantiomer selectivity of matairesinol O-methyltransferases. *Plant Biotechnology* 31 (3), 257–267.
- Rahfeld, B., 2017. Mikroskopischer Farbatlas pflanzlicher Drogen, 3. Auflage ed. Springer Spektrum, Berlin, 415 pp.
- Rechinger, K.H., 1974. Linaceae, in: Rechinger K.H. (Hrsg.) (Ed.), *Flora Iranica - Flora des iranischen Hochlandes und der umrahmenden Gebirge - Persien, Afghanistan, Teile von West-Pakistan, Nord-Iraq, Azerbaidjan, Turkmenistan*. Akademische Druck- und Verlagsanstalt, Graz (Austria).
- Rogers, S.O., Bendich, A.J., 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology* 5 (2), 69–76.
- Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M., Henikoff, S., 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research* 26 (7), 1628–1635.
- Scotto-Lavino, E., Du, G., Frohman, M.A., 2006a. 3' End cDNA amplification using classic RACE. *Nature Protocols* 1 (6), 2742–2745.
- Scotto-Lavino, E., Du, G., Frohman, M.A., 2006b. 5' end cDNA amplification using classic RACE. *Nature Protocols* 1 (6), 2555–2562.
- Seidel, V., Windhövel, J., Eaton, G., Alfermann, W.A., Arroo, R.R., Medarde, M., Petersen, M., Woolley, J.G., 2002. Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. *Planta* 215 (6), 1031–1039.
- Smolny, T., Wichers, H., Kalenberg, S., Shasavari, A., Petersen, M., Alfermann, A.W., 1998. Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *linum album*. *Phytochemistry* 48 (6), 975–979.
- Smolny, T., Wichers, H., Rijk, T. de, van Zwam, A., Shasavari, A., Alfermann, A.W., 1992. Formation of Lignans in Suspension Cultures of *Linum album*. *Planta Medica* 58 (S 1), 622–624.

- Thompson, L.U., 1998. 9 Experimental studies on lignans and cancer. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 12 (4), 691–705.
- Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., Oreopoulou, V., 2007. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* 12 (3), 593–606.
- Umezawa, T., 2003. Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 2 (3), 371–390.
- Umezawa, T., 2010. The cinnamate/monolignol pathway. *Phytochem Rev* 9 (1), 1–17.
- Umezawa, T., Davin, L.B., Lewis, N.G., 1991. Formation of lignans (-)-secoisolariciresinol and (-)-matairesinol with *Forsythia intermedia* cell-free extracts. *J. Biol. Chem.* 266 (16), 10210–10217.
- Umezawa, T., Ragamustari, S.K., Nakatsubo, T., Wada, S., Li, L., Yamamura, M., Sakakibara, N., Hattori, T., Suzuki, S., Chiang, V.L., 2013. A lignan O-methyltransferase catalyzing the regioselective methylation of matairesinol in *Carthamus tinctorius*. *Plant Biotechnology* 30 (2), 97–109.
- van Fürden, B., Humburg, A., Fuss, E., 2005. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 24 (5), 312–317.
- van Uden, W., Bouma, A.S., Bracht Waker, J.F., Middel, O., Wichers, H.J., Waard, P. de, Woerdenbag, H.J., Kellogg, R.M., Pras, N., 1995. The production of podophyllotoxin and its 5-methoxy derivative through bioconversion of cyclodextrin-complexed desoxypodophyllotoxin by plant cell cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 42 (1), 73–79.
- van Uden, W., Oeij, H., Woerdenbag, H.J., Pras, N., 1993. Glucosylation of cyclodextrin-complexed podophyllotoxin by cell cultures of *Linum flavum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34 (2), 169–175.
- van Uden, W., Pras, N., Vossebeld, E.M., Mol, J.N.M., Malingré, T.M., 1990. Production of 5-methoxypodophyllotoxin in cell suspension cultures of *Linum flavum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 20 (2), 81–87.
- Weathers, P.J., Towler, M.J., Xu, J., 2010. Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied microbiology and biotechnology* 85 (5), 1339–1351.
- Wichers, H.J., Harkes, M.P., Arroo, R.R.J., 1990. Occurrence of 5-methoxypodophyllotoxin in plants, cell cultures and regenerated plants of *Linum flavum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23 (2), 93–100.
- Wichers, H.J., Versluis-De Haan, G.G., Marsman, J.W., Harkes, M.P., 1991. Podophyllotoxin related lignans in plants and cell cultures of *Linum flavum*. *Phytochemistry* 30 (11), 3601–3604.

- Willits, M.G., Giovanni, M., Prata, R.T.N., Kramer, C.M., Luca, V. de, Steffens, J.C., Graser, G., 2004. Bio-fermentation of modified flavonoids: an example of in vivo diversification of secondary metabolites. *Phytochemistry* 65 (1), 31–41.
- Wilson, S.A., Roberts, S.C., 2012. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant biotechnology journal* 10 (3), 249–268.
- Winkler, H., 1931. Linaceae, in: Engler, A., Harms, H. (Eds.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigsten Arten, insbesondere den Nutzpflanzen: 19 a Angiospermae: Reihe Pandales*, Berlin, pp. 82–129.
- Wolters, S., Neeb, M., Berim, A., Schulze Wischeler, J., Petersen, M., Heine, A., 2013. Structural analysis of coniferyl alcohol 9-O-methyltransferase from *Linum nodiflorum* reveals a novel active-site environment. *Acta Cryst D* 69 (5), 888–900.
- Wu, X., Wu, J., Luo, Y., Bragg, J., Anderson, O., Vogel, J., Gu, Y.Q., 2013. Phylogenetic, Molecular, and Biochemical Characterization of Caffeic Acid O-Methyltransferase Gene Family in *Brachypodium distachyon*. *International Journal of Plant Genomics* 2013.
- Xia, Z.Q., Costa, M.A., Pelissier, H.C., Davin, L.B., Lewis, N.G., 2001. Secoisolariciresinol dehydrogenase purification, cloning, and functional expression. Implications for human health protection. *The Journal of biological chemistry* 276 (16), 12614–12623.
- Xia, Z.-Q., Costa, M.A., Proctor, J., Davin, L.B., Lewis, N.G., 2000. Dirigent-mediated podophyllotoxin biosynthesis in *Linum flavum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry* 55 (6), 537–549.
- Zhong, R., 1998. Dual Methylation Pathways in Lignin Biosynthesis. *THE PLANT CELL ONLINE* 10 (12), 2033–2046.
- Zubieta, C., He, X.-Z., Dixon, R.A., Noel, J.P., 2001. Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases. *Nature Structural & Molecular Biology* 8 (3), 271.
- Zubieta, C., Kota, P., Ferrer, J.-L., Dixon, R.A., Noel, J.P., 2002. Structural Basis for the Modulation of Lignin Monomer Methylation by Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid 3/5-O-Methyltransferase. *The Plant Cell* 14 (6), 1265–1277.

5. ANHANG

5.1. ABKÜRZUNGEN

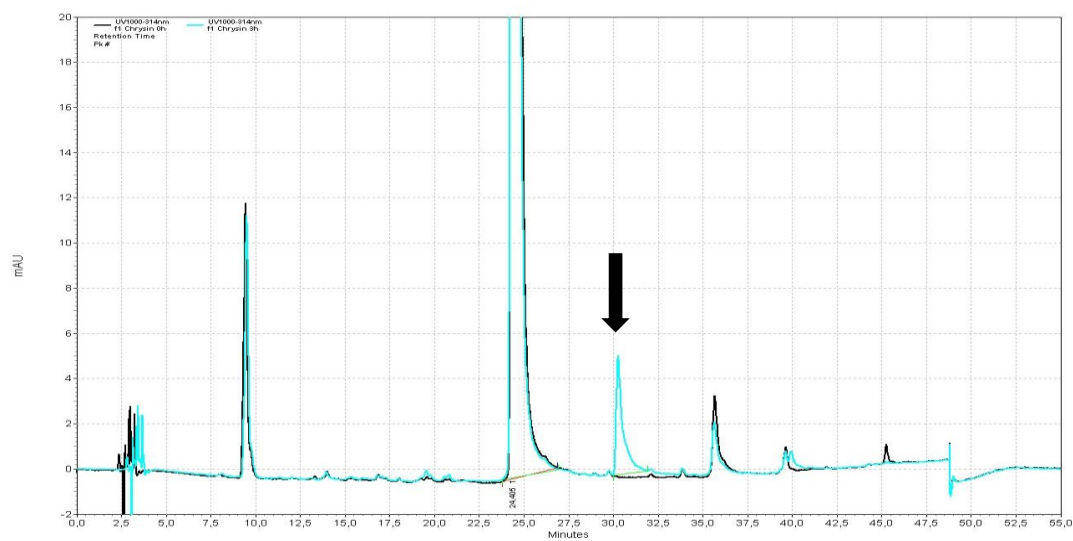
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAP	6-Benzylaminopurin
BSA	Bovine serum album = Rinderserumalbumin
Ca9Me	Coniferylalkohol 9-O-Methylether
Ca9OMT	Coniferylalkohol 9-O-Methyltransferase
CODEHOP	Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer
COMT	Kaffeesäure O-Methyltransferase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CYP	Cytochrom P450
DC	Dünnschichtchromatographie
DIECA	Diethyldithiocarbamat
dNTP	Desoxynukleotide
DOP	Desoxypodophyllotoxin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
GPRT	Genspezifischer Primer für die Reverse Transkriptase
GSP	Genspezifischer Primer
HKG	Haushaltsgen
IES	Indol-3-essigsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
KPi	Kaliumphosphat-Puffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4)
LaCOMT	Kaffeesäure O-Methyltransferase aus <i>Linum album</i>
LnCOMT	Kaffeesäure O-Methyltransferase aus <i>Linum nodiflorum</i>
MeJa	Methyljasmonat
MeOH	Methanol
MPTOX	6-Methoxypodophyllotoxin
NAA	Naphthylessigsäure

NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert
NTC	Non-Template Control; Negativkontrolle
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAL	Phenylalanin Ammoniak-Lyase
PEG	Polyethylenglycol
PTOX	Podophyllotoxin
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumlaurylsulfat
Tdt	Terminale Desoxynucleotidyltransferase
TG	Trockengewicht
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

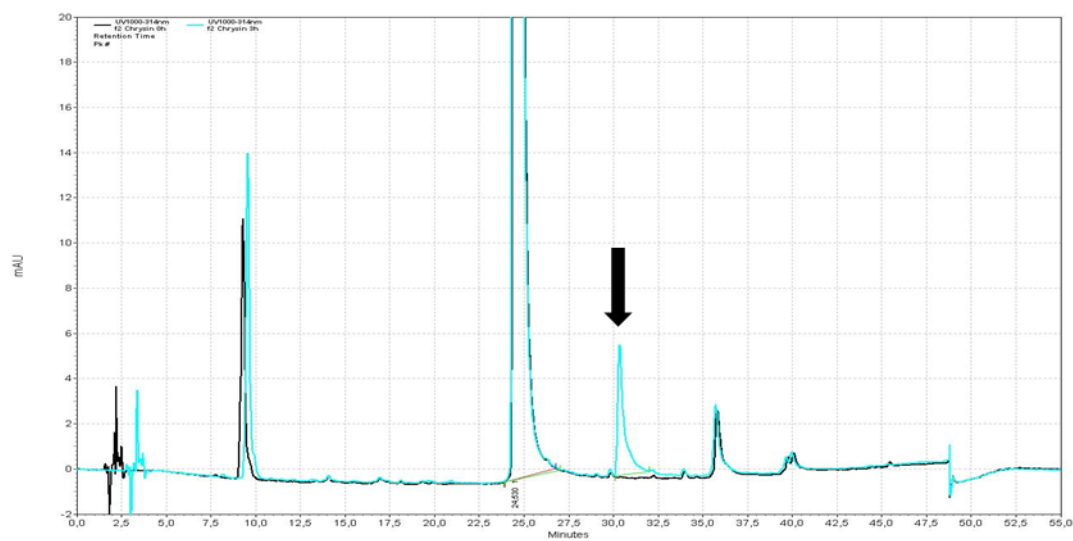
Abkürzungen Aminosäuren

A	Alanin, Ala
C	Cystein, Cys
D	Asparaginsäure, Asp
E	Glutaminsäure, Glu
F	Phenylalanin, Phe
G	Glycin, Gly
H	Histidin, His
I	Isoleucin, Ile
K	Lysin, Lys
L	Leucin, Leu
M	Methionin, Met
N	Asparagin, Asn
P	Prolin, Pro
Q	Glutamin, Gln
R	Arginin, Arg
S	Serin, Ser
T	Threonin, Thr
V	Valin, Val
W	Tryptophan, Trp
Y	Tyrosin, Tyr

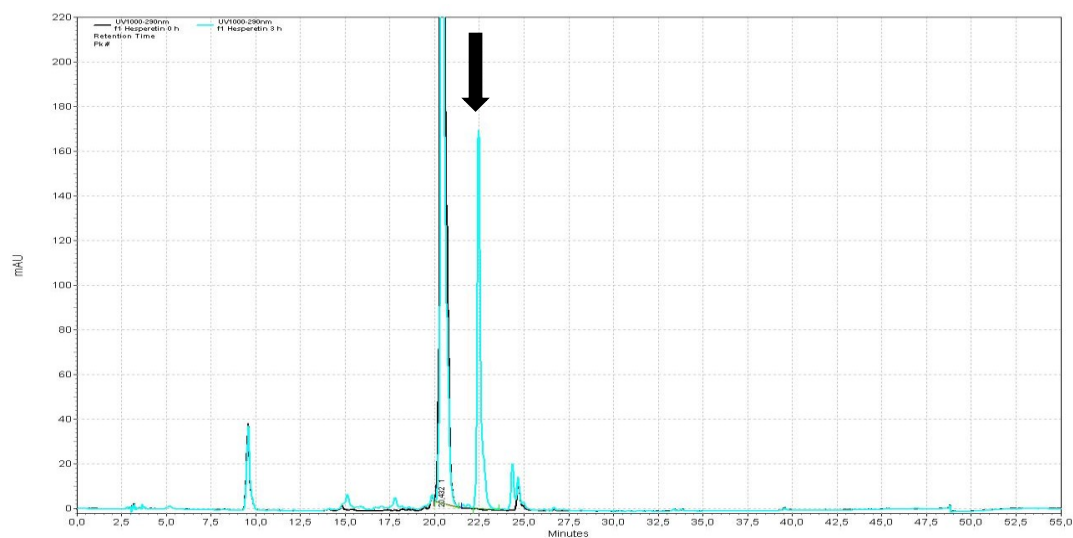
5.2. CHROMATOGRAMME



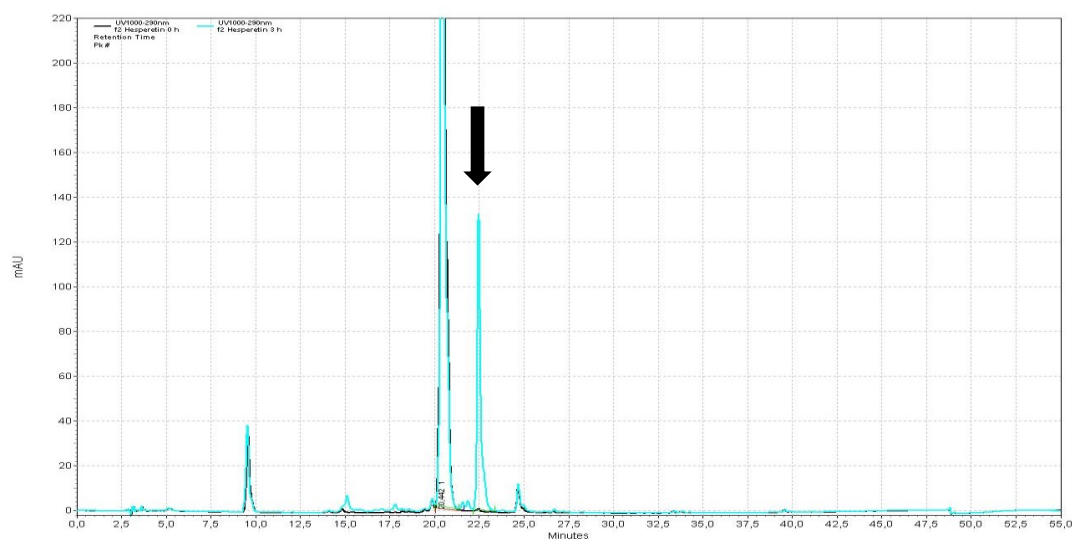
Enzymtest von LnMT3 mit Chrysin nach 0 h (schwarz) und 3 h (blau) Inkubationszeit



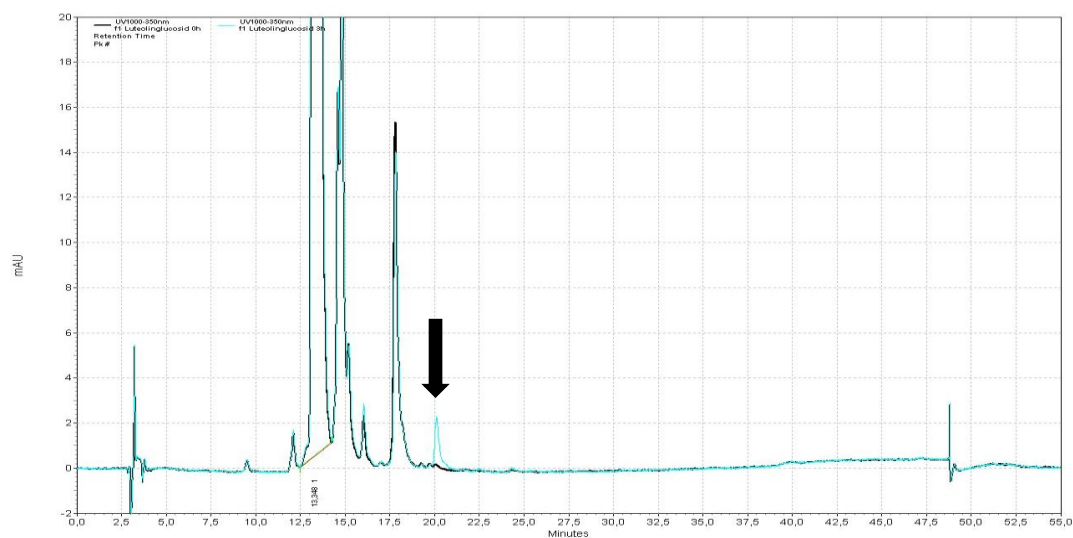
Enzymtest von LnMT3s mit Chrysin nach 0 h (schwarz) und 3 h (blau) Inkubationszeit



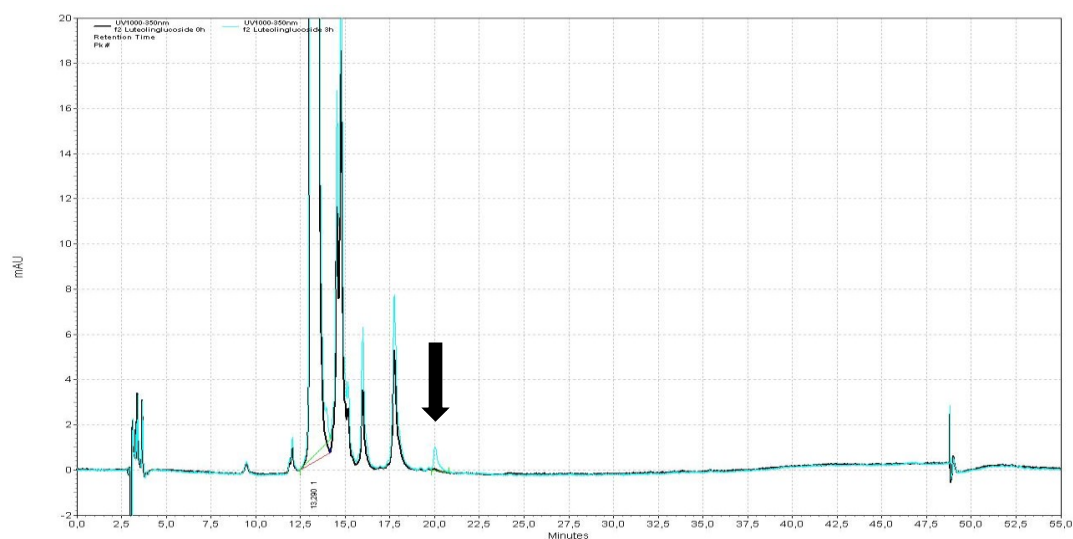
Enzymtest von LnMT3 mit Hesperetin nach 0 h (schwarz) und 3 h (blau) Inkubationszeit



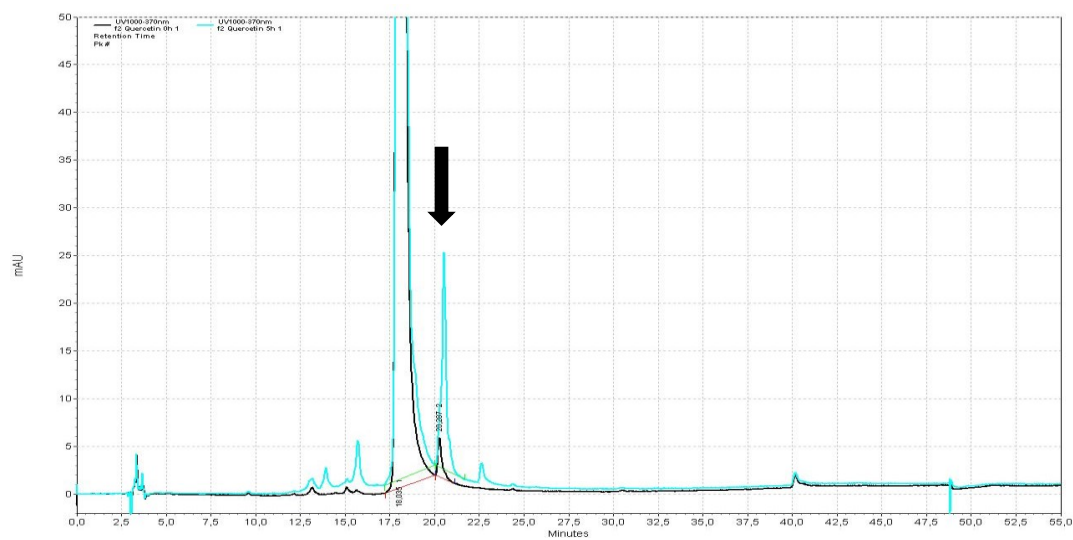
Enzymtest von LnMT3s mit Hesperetin nach 0 h (schwarz) und 3 h (blau) Inkubationszeit



Enzymtest von LnMT3 mit Luteolin-7-Glucosid nach 0 h (schwarz) und 3 h (blau) Inkubationszeit



Enzymtest von LnMT3s mit Luteolin-7-Glucosid nach 0 h (schwarz) und 3 h (blau) Inkubationszeit

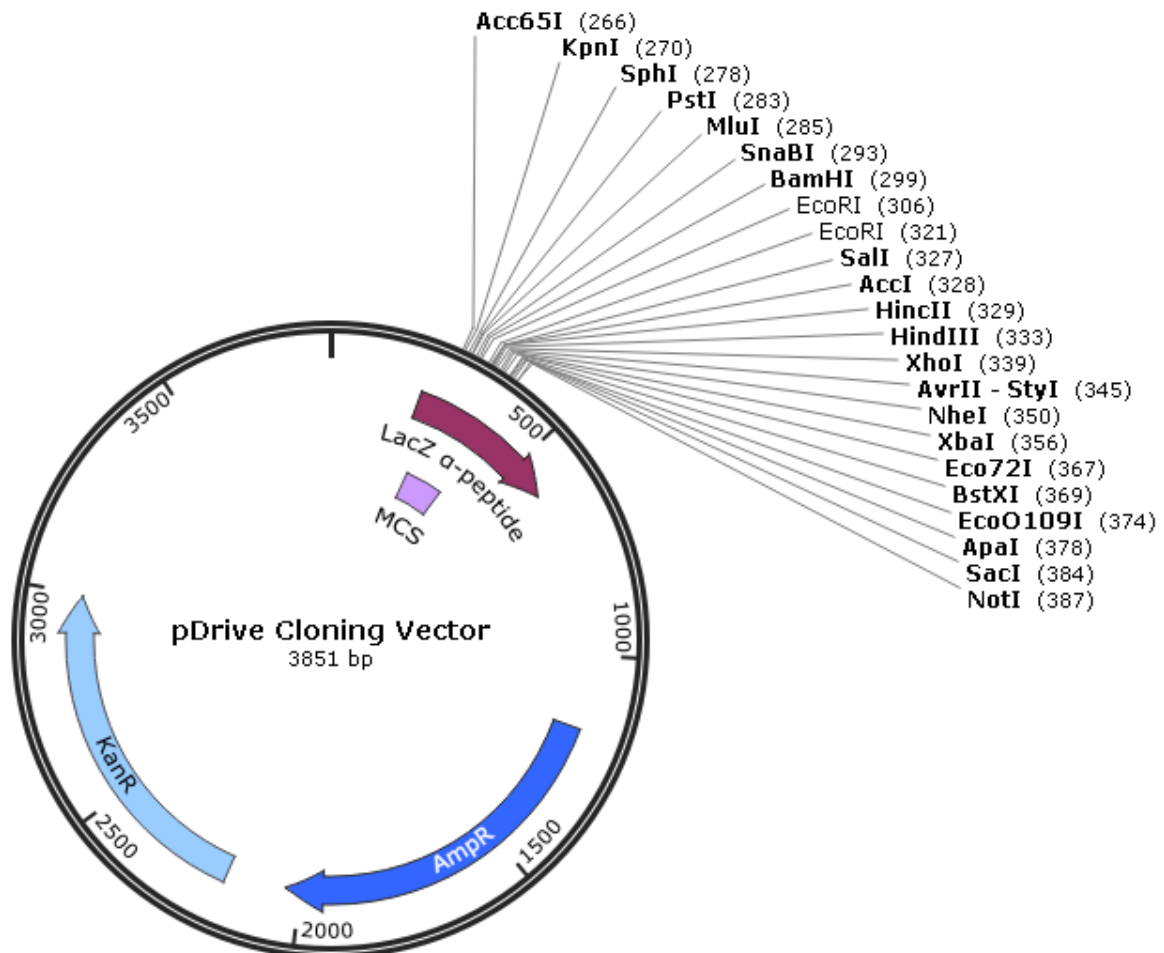


Enzymtest von LnMT3s mit Quercetin nach 0 h (schwarz) und 3 h (blau) Inkubationszeit

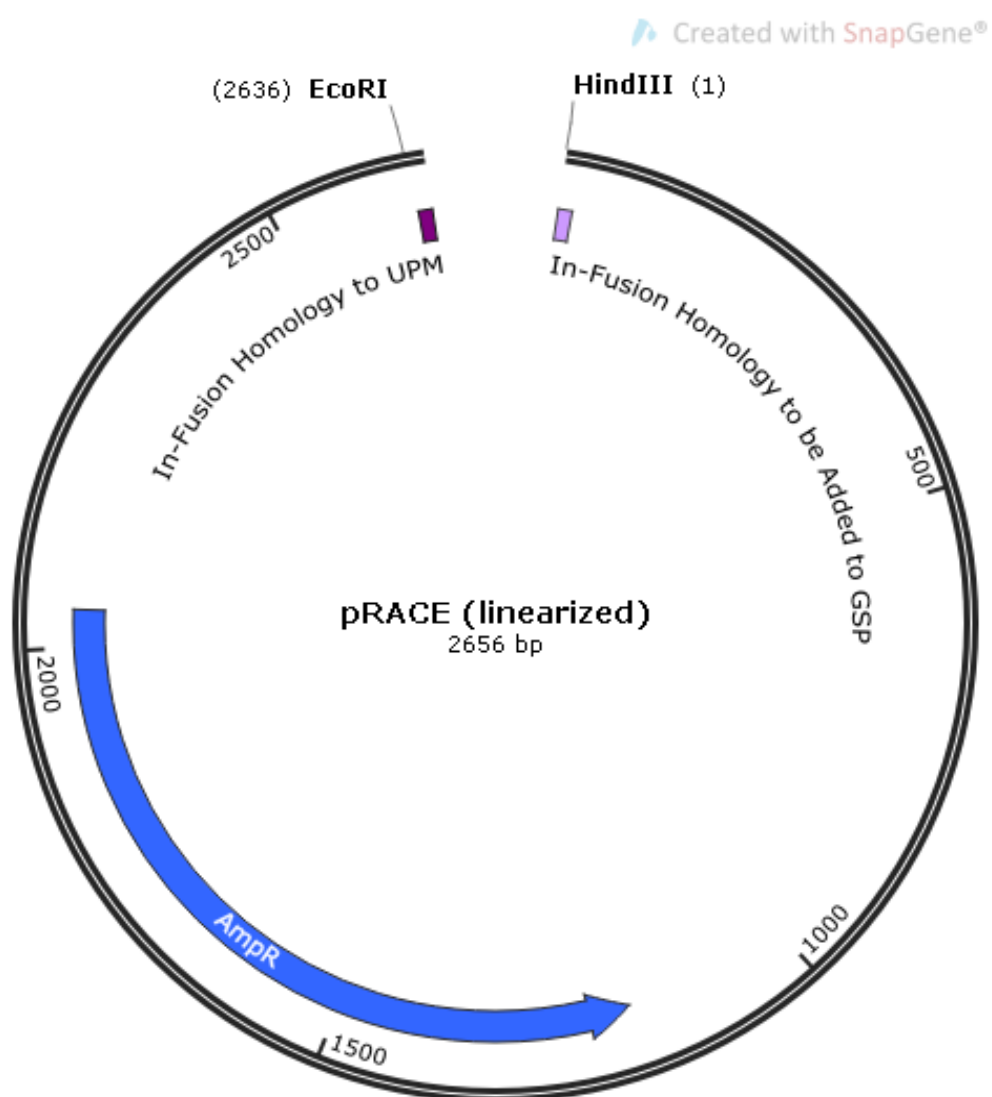
5.3. VEKTORKARTEN

5.3.1. pDrive Cloning Vector

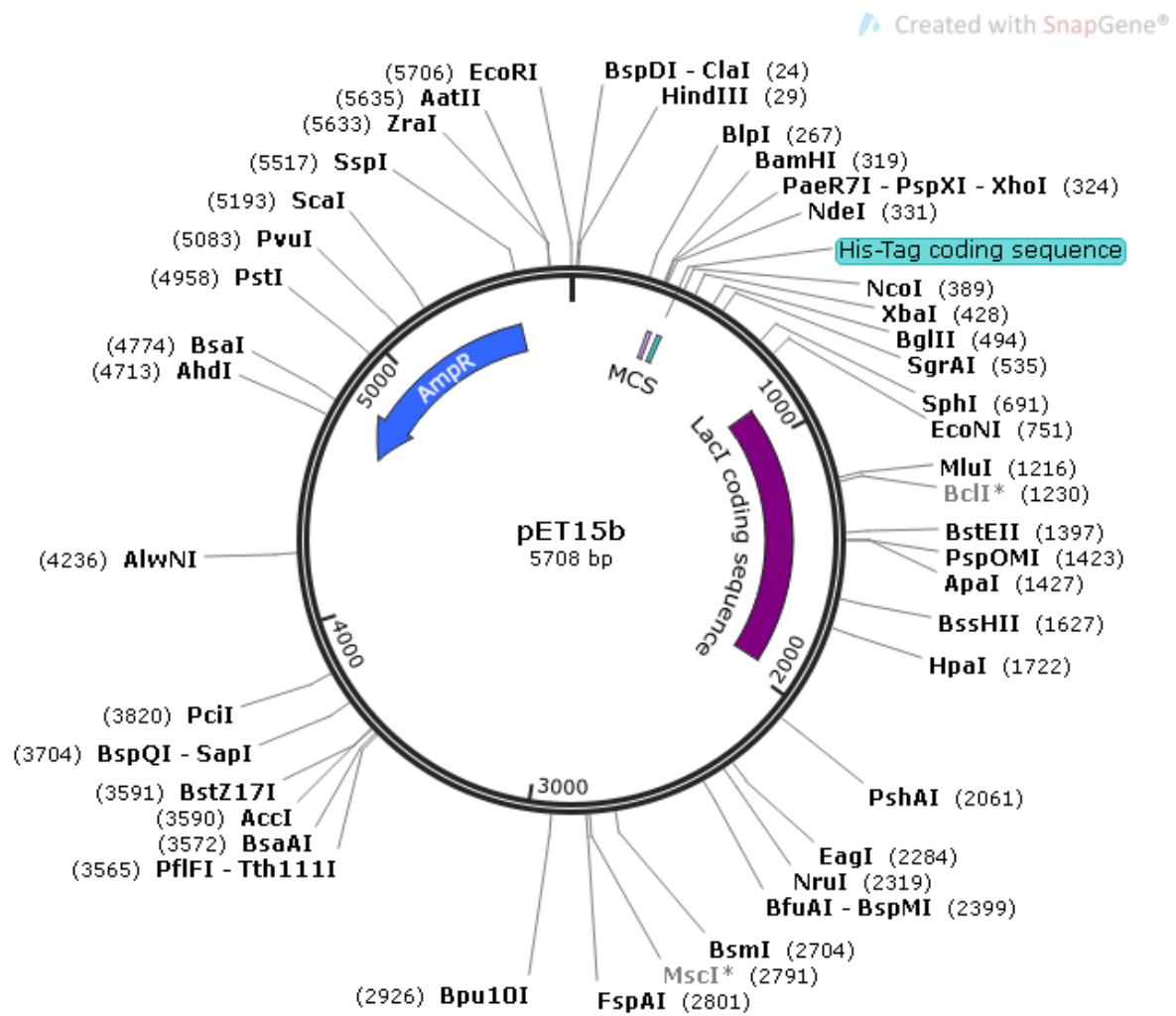
Created with SnapGene®



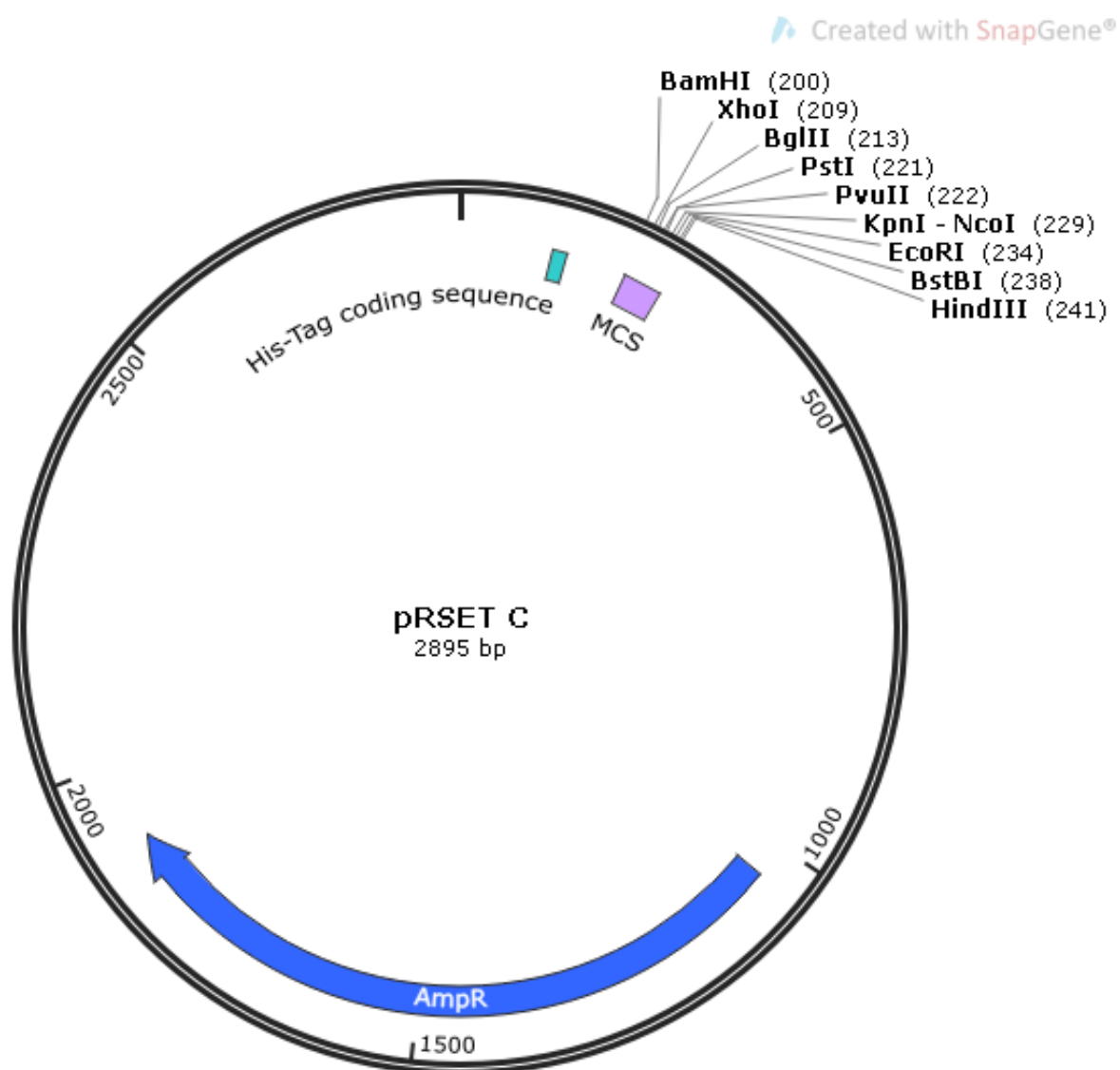
5.3.2. pRACE



5.3.3. pET15b



5.3.4. pRSET C



Veröffentlichungen

Vorträge und Posterpräsentationen:

Lignan biosynthesis in different *Linum* species

Botanikertagung in Tübingen, 2013 (Poster)

Methyltransferases involved in the lignan biosynthesis of *Linum nodiflorum*

Erster Eduard Strasburger-Workshop der Deutschen Botanischen Gesellschaft in Nürnberg, 2014 (Vortrag)

Methyltransferases in lignan biosynthesis

Botanikertagung in Freising, 2015 (Poster)

Methyltransferases found in *Linum* species

Doktorandentagung der Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft in Meisdorf, 2016 (Vortrag)

Identification of methyltransferases in *Linum* species

DPhG-Doktorandentagung in Frankfurt, 2017 (Kurzvortrag und Poster)

